Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von Leukozyten- und Fibroblasteninterferon auf die Zellvermehrung von Tumoren im Kindesalter in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Rhabdomyosarkom und Neuroblastom sowie auf die Zellvermehrung von Fibroblasten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
DIETER MAYER-EICHBERGER
aus Stuttgart

1984

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von Leukozyten- und Fibroblasteninterferon auf die Zellvermehrung von Tumoren im Kindesalter in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Rhabdomyosarkom und Neuroblastom sowie auf die Zellvermehrung von Fibroblasten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
DIETER MAYER-EICHBERGER
aus Stuttgart

1984

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. E. Heidemann

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Für

unsere Kinder KATHARINA und VALENTIN

die zu derselben Zeit wie diese Arbeit geboren wurden

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung		4
1.	Material und Methoden	12
1.1.	Materialien und Geräte	12
1.2.	Methoden	14
1.3.	Wachstumsverhalten der Zellen	16
1.4.	Fehlerquellen	22
1.4.1.	Zellwachstum	22
1.4.2.	Meßfehler	23
1.4.3.	Interferon	23
1.4.4.	Pipettierfehler	23
2.	Ergebnisse	24
2.1.	Art der Darstellung der Ergebnisse	24
2.1.1.	Kurve der absoluten Wachstumsraten	24
2.1.2.	Kurve der relativen Wachstumsraten	25
2.1.3.	Kurve der iterativen Wachstumsraten	27
2.1.4.	Kurve der relativen iterativen Wachstumsraten	28
2.1.5.	Zeichenerklärung	29
2.2.	Analyse des Wachstums der einzelnen Zellinien unter Interferoneinfluß	30
2.2.1.	Fibroblasten	30
2.2.1.1.	Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml	30
2.2.1.2.	Ausgangszellzahl: $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml	30

2.2.5. Rhabdomyosarkom CCL 136 43

2.2.5.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml 43

2.2.5.2. Ausgangszellzahl: $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml 50

2.2.6. Neuroblastom CCL 127 57

2.2.6.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml 57

2.2.7. Neuroblastom SK-N-FI 64

2.2.7.1. Ausgangszellzahl: $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml 64

2.3. Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN-α und IFN-β auf die verschiedenen Zellinien 71

2.3.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml 71

2.3.2. Ausgangszellzahl: $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml 77

2.4. Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN-β mit der einer Mock-Interferon-Präparation 82

2.7. IFN-β in Kombination mit Methotrexat 89

Diskussion 93

Literaturverzeichnis 101

Zusammenfassung 104

Um eine gemeinsame Diskussion der im Team gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit sowie der meiner Frau mit dem Titel " Einfluß von Leukozyten- und Fibroblasteninterferon auf die Zellvermehrung von Tumoren im Kindesalter in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Osteogenem Sarkom und Nasopharynxcarcinom" zu erleichtern und um zu verhindern, daß wertvolle

Informationen verloren gehen, werden die Inhaltsverzeichnisse beider Arbeiten aufeinander abgestimmt und die Ergebnisse gemeinsam diskutiert.

EINLEITUNG

Seit 1935 ist das Phänomen der Virusinterferenz bekannt: An einem Virus erkrankte Affen sind gegen Infektionen mit anderen Viren resistent.
1957 gelingt es ISAACS und LINDENMANN, in einem einfachen Experiment zu zeigen, daß dieses Phänomen durch eine Substanz verursacht wird, die sie INTERFERON nennen[17]:

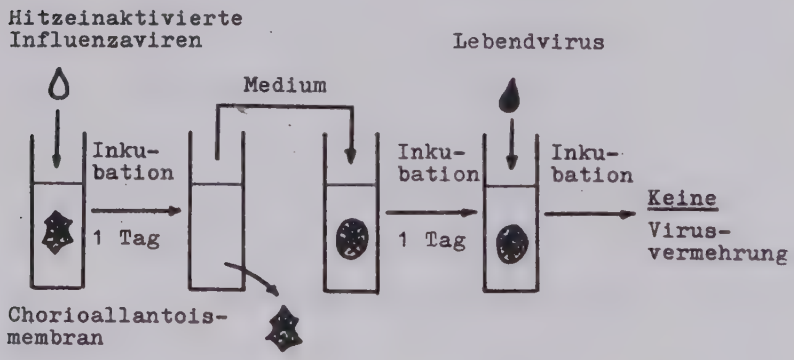

Abb. 1: Schematische Darstellung des grundlegenden Experiments von ISAACS und LINDENMANN[19,17]

Hitzeinaktivierte Influenzaviren werden Stücken einer Chorioallantoismembran eines Hühnereis hinzugefügt, die Membran wird gewaschen und so nicht absorbierte Viren entfernt. Anschließend wird sie für mehrere Stunden bei 37°C inkubiert. Die Membranteile werden aus dem Medium genommen und frische Membranteile in diesem Medium für 18 - 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Dann werden lebende Influenzaviren hinzugegeben. Sie vermehren sich nicht, d.h. das Gewebe hat, während es mit inaktiviertem Virus inkubiert war, einen Stoff abgegeben, der die Vermehrung des lebenden Virus hemmt. Dieser Stoff wird Interferon genannt. Die Produktion und Reinigung des Interferons in ausreichenden Mengen für in vitro und in vivo Versuche war lange Zeit ein großes Problem. Vier Verfahren werden gegenwärtig angewendet, um größere Mengen Interferon zu produzieren[19]:

1. Leukozyteninterferon oder IFN-α wird aus dem Buffy-Coat von Blutkonserven hergestellt. Dabei handelt es sich um die leukozytenreiche Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Plasma, der als induzierendes Agens Sendai Virus oder andere Substanzen wie Poly rI·Poly rC oder Bakterien zugesetzt werden.
2. Fibroblasteninterferon oder IFN-β wird von menschlichen Fibroblasten unter Stimulation in Zellkulturen produziert.
3. Immuninterferon oder IFN-γ wird von Lymphoblasten oder Lymphozyten unter dem Einfluß von mitogenen Substanzen produziert.
4. Mit Hilfe der Gentechnologie ist es gelungen, α- und β-Interferon mittels Gentransplantation aus Colibakterien zu gewinnen[7].

Die Interferone unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrem Zuckeranteil.

Die Erkenntnisse über die Wirkungen des Interferons sind immer mannigfaltiger geworden. Bis heute sind folgende Wirkprinzipien bekannt[7]:

1. Inhibition von RNS- und DNS-Virusreplikation
   Inhibition von Transformation lymphatischer Zellen
2. Inhibition der Zellmultiplikation
   Stimulation der Zelldifferenzierung
   Änderung der Membranstruktur
   a) Zunahme der HLA-Expression
   b) Expression von Fc-Rezeptoren
   c) Änderung der Zellrigidität
   d) Änderung am Zellskelett
   e) Änderung von Membranlipiden
3. Modulation des Immunsystems
   Depression des B-Zellsystems
   Stimulation der Phagozytose
   Stimulation der Zytotoxizität
   a) T-Zellen
   b) Natural Killer Zellen

Der Wirkungsmechanismus der Interferone ist nicht vollständig geklärt. Die größten Erkenntnisse besitzen wir über den molekularbiologischen Mechanismus der antiviralen Wirkung. Er wird in Abb. 2 vereinfacht dargestellt.

Sehr viel weniger wissen wir über die antitumorale Wirkung des Interferons. Einige mögliche Mechanismen seien hier aufgeführt:

1. IFN-Wirkung auf die Tumorzelle durch

-Hemmung der Zellvermehrung

-Modifikation der Tumorzelloberfläche

-Reversion der Malignität (Polymorphie, keine Koloniebildung, keine Tumorinduktion)

2. IFN-Wirkung auf die Körperabwehr durch

-Lymphozyten- und Makrophagenstimulation

-Antikörperstimulation

3. Hemmung des Tumorvirus

4. unspezifische Wirkungen

Die Definition des Interferons hat sich im Laufe der Zeit - entsprechend der Zunahme des Wissens - immer wieder geändert.

Heute können wir Interferone definieren als eine Gruppe von Glykoproteinen, die auf bestimmte Reize hin von eukaryontischen Zellen abgegeben werden mit der Fähigkeit, die Virusreplikation zu hemmen[7].

Eine Internationale Interferoneinheit wird definiert als diejenige Menge Interferon, die bei Vorbehandlung eines Zellrasens und nachfolgender Infektion durch einen Virus die Menge neugebildeten Virus' um 50% reduziert[14].

Zur Messung des Interferongehalts einer Lösung werden gegenwärtig vor allem Plaque-Reduction Assays und Cytopathic Effect Assays verwendet[19]. Die gewonnenen Ergebnisse werden mit denen standardisierter Lösungen bekannten Interferongehalts verglichen.

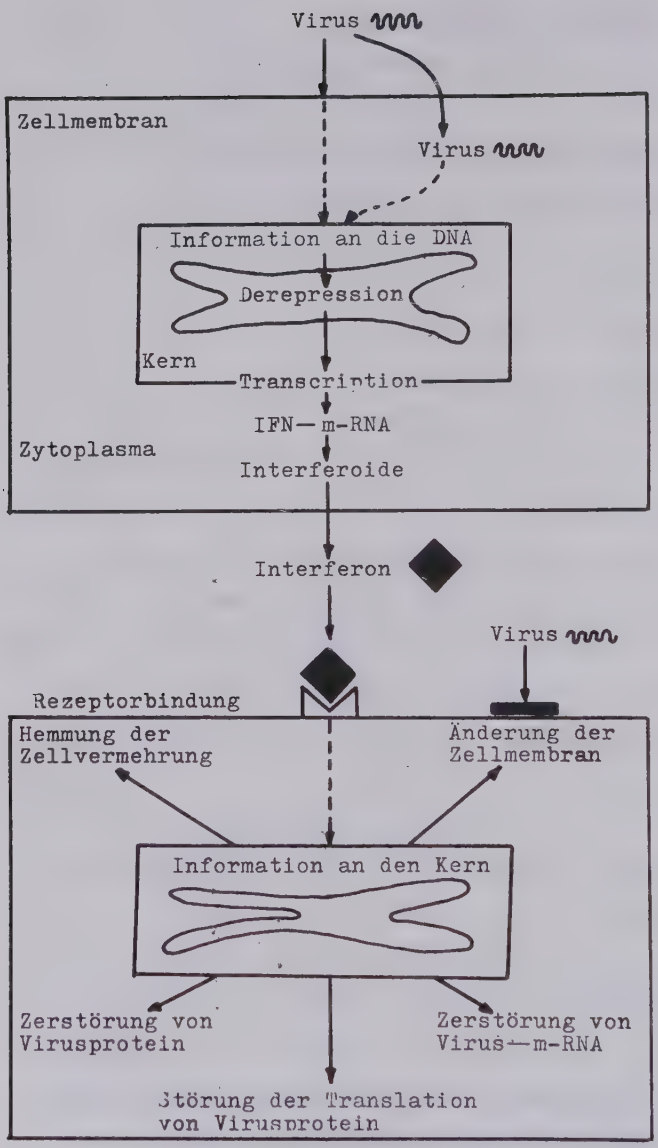

Abb. 2: Modell des antiviralen Wirkungsmechanismus des Interferons

Unser Interesse gilt besonders dem antiproliferativen Effekt des Interferons.

Auf der Suche nach neuen Mitteln gegen Krebs wird Interferon bezüglich seiner zytostatischen Wirkung in vitro und in vivo getestet.

STRANDER behandelt seit 1971 Osteosarkompatienten mit Leukozyteninterferon[1,2,3]. Nach $2\frac{1}{2}$ Jahren sind 64% der mit Interferon behandelten Patienten frei von Metastasen, während nur 30% der Kontrollgruppe noch keine Metastasen aufweisen.

TREUNER et al. erzielten bei einem Patienten, der an Nasopharynxcarcinom erkrankt ist, durch Behandlung mit Fibroblasteninterferon eine vollständige Regression des Tumors[6].

Begleitend zu diesen klinischen Studien liegen relativ wenig in vitro Untersuchungen über die wachstumshemmende Wirkung von Interferonen bei verschiedenen menschlichen Tumoren vor.

STRANDER untersuchte die Wirkung von Leukozyteninterferon an Zellinien des Burkitt Lymphoms, Osteosarkoms, Mamma-Carcinoms und an Zellinien von Fibroblasten und Gliazellen[1,2,3]. PFEFFER et al. befaßten sich mit der wachstumshemmenden Wirkung von Fibroblasteninterferon bei verschiedenen Fibroblastenzellinien[4]. Auch KUWATA et al. untersuchten die Empfindlichkeit verschiedener Fibroblastenzellinien bezüglich Leukozyten- und Fibroblasteninterferon[10].

Wir wollen Ergebnisse gewinnen über die Wirkung von Fibroblasten- und Leukozyteninterferon an etablierten

Zellinien verschiedener Tumoren, die hauptsächlich im Kindesalter vorkommen: Osteosarkom, Neuroblastom, Rhabdomyosarkom, Nasopharynxcarcinom. Es soll untersucht werden, wie empfindlich die Tumorzellen auf die beiden Interferone reagieren, und ob sie wesentlich stärker in ihrem Wachstum gehemmt werden als normale menschliche Zellen (Fibroblasten). Die Ergebnisse sollen Hinweise geben, welche Tumoren besonders für eine Interferonbehandlung geeignet sind. Weiter interessiert uns, welches der beiden Interferone die bessere antiproliferative Wirkung aufweist, in welchem Ausmaß diese Wirkung reversibel ist, und mit welchem Effekt sich die beiden Stoffe kombinieren lassen.

Von großer Wichtigkeit ist die Frage, inwieweit die antiproliferative Wirkung durch Verunreinigung der Interferonpräparation mit Begleitstoffen zustande kommt. Dies wurde schon 1979 von PFEFFER et al. für Fibroblasteninterferon untersucht, die Autoren konnten keine wachstumshemmende Wirkung der Begleitsubstanzen feststellen[4].

Tumoren werden heute mit einer Kombinationstherapie verschiedener Zytostatika behandelt. Vielleicht ist es möglich, auch Interferon mit Erfolg in ein Kombinationsschema einzubeziehen. BROSTRÖM hat die Kombination von Leukozyteninterferon mit Methotrexat bei Osteosarkom- und Lymphomzellinien untersucht[11]. Wir wollen nun Fibroblasteninterferon und Methotrexat

kombinieren und die Wirkung dieser Kombination bei einer Osteosarkomzellinie austesten.

1. MATERIAL UND METHODEN

1.1. Materialien und Geräte

Zellinien:

- Fibroblasten: FS 4, Dr. RENTSCHLER, Laupheim
- Osteogenes Sarkom: SAOS-2, Dr. JØRGEN FOGH, Sloan-Kettering Institute of Cancer Research
  TE-85, McALLISTER 1971
- Rhabdomyosarkom: CCL 136, McALLISTER 1968
- Neuroblastom: CCL 127, W.W.NICHOLS, J.LEE, S.DWIGHT, 1967, Sloan-Kettering Institute of Cancer Research
  SK-N-FI, Dr. JØRGEN FOGH, Sloan-Kettering Institute of Cancer Research
- Nasopharynxcarcinom: CCL 138, PETERSON, W.D., Jr., et al., 1971

Minimum Essential Medium (MEM) mit Earles Salzen
Glutamin
Phenolrot
Bicarbonat 0,25 g/l
Hepes Puffer 20 mM
Gentamycin 50 µg/ml
10 % foetales Kälberserum
zur Verfügung gestellt von Dr. RENTSCHLER, Laupheim

Versen-Trypsin, Dr. RENTSCHLER, Laupheim

Ampuwa^{R}: steriles, pyrogenfreies Wasser, FRESENIUS

Trypanblau 0,4 %

Interferone:

- IFN-α: humanes Leukozyteninterferon, spez. Aktivität: $1 \cdot 10^{6}$ E/mg Protein, Dr. CANTELL, Helsinki
- IFN-β: humanes Fibroblasteninterferon, spez. Aktivität: $1 \cdot 10^{6}$ E/mg Protein, Dr. RENTSCHLER, Laupheim
- Mock-Interferon: Mock-Präparation aus hitzeinaktiviertem Fibroblasteninterferon spez. Aktivität < 90 E/mg Protein Dr. RENTSCHLER, Laupheim

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Kulturflaschen: 250 ml, NUNCON^{R}, INTERMED

Sechs-Loch-Platten: beschichtet
Fassungsvermögen: 9,6 ml
Fläche: 9,62 cm^{2}
LINBRO^{R} Division, FLOW LABORATORIES

Brutschrank: NATIONAL^{R}, HEINEKE COM.

Phasenkontrastmikroskop: IM^{R}, OLYMPUS
Vergrößerungen: 40-, 100-, 200-, 400-fach

Laminar Flow Area: Fallstromprinzip, CEAG SCHIRP Reinraumtechnik, Bork / Westfalen

Coulter Counter: COULTER ELECTRONICS, Dunstable, Beds., England

1.2. Methoden

Die Zellen werden als Monolayer in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml Medium oder $2{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/ml Medium in Sechs-Loch-Platten angesetzt. Jedes Loch enthält also bei Versuchsbeginn $1{,}04 \cdot 10^4$ Zellen/cm^2, bzw. $2{,}6 \cdot 10^3$ Zellen/cm^2 bei einer Grundfläche von 9,62 cm^2.

Pro Versuch werden 3 Sechs-Loch-Platten mit je 2 Kontrollwerten und 4 interferonabhängigen Werten angesetzt. Wir erhalten also mit einem Versuchsansatz 18 Werte, 6 Werte sind Kontrollwerte, die restlichen 12 interferonabhängige Werte. Da wir gleichzeitig 4 verschiedene Interferonkonzentrationen ansetzen, erhalten wir 3 Werte pro Interferonkonzentration.

4 Tage nach Ansetzen der Zellen wird das Medium ohne erneute Interferonzugabe gewechselt.

Nach einer Woche wird das Zellwachstum gemessen: Dazu wird das Medium mit Pasteurpipetten über dem Zellrasen abgesaugt, die Zellen sodann mit 0,5 ml Trypsin vom Untergrund und voneinander gelöst und in 2,5 ml 37°C warmem Medium suspendiert. Die Zellkonzentration dieser Suspension wird durch Zellzählung im Coulter Counter ermittelt. Unmittelbar anschließend werden die Zellen in ihrer Ausgangskonzentration wieder angesetzt.

Der Anteil der toten Zellen wird mit der Trypanblaufärbung ermittelt. Sie beruht auf der Durchlässigkeit

von toten Zellen für den Farbstoff Trypanblau.
Die Gesamtversuchsdauer beträgt 5 Wochen.
Interferon wird mit Ampuwa^{R} verdünnt. Es werden 4 Standardverdünnungen in großen Mengen hergestellt: 10^5 E/ml, 10^4 E/ml, 10^3 E/ml, 10^2 E/ml.
Die Verdünnungen werden bei -70°C gelagert. In regelmäßigen Abständen werden Proben zur Ermittlung der Interferonaktivität entnommen. Die Bestimmungen werden von der Fa. RENTSCHLER mittels des Cytopathic Effect Assays[19] durchgeführt.
Den Ansätzen werden jeweils 400 µl der Interferonverdünnungen zugesetzt, das ergibt bei insgesamt 4 ml Zellsuspension eine Interferonkonzentration von 10^4, 10^3, 10^2, 10^1 E/ml Zellsuspension.
Interferon wird den Zellen beim Ansetzen des Versuchs und dann wöchentlich beim Wiederansetzen der Zellsuspension hinzugegeben.

1.3. Wachstumsverhalten der Zellen

Bei gleichbleibenden Wachstumsbedingungen kann die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen als eine Konstante angenommen werden, so daß sich unter idealen Verhältnissen eine exponentielle Wachstumskurve ergibt. Die Vermehrung der Zellen wird jedoch durch die gegebene Nährstoffmenge und den Raum limitiert, so daß die Exponentialkurve in eine Sättigungskurve übergeht.(Abb. 3)[20]

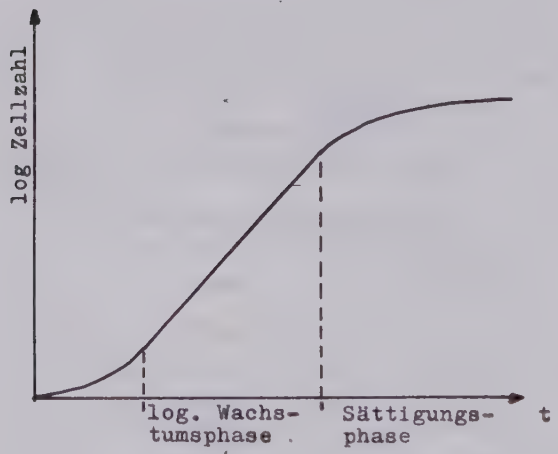

Abb. 3: Zellwachstum in Abhängigkeit von der Zeit

Für den Neuansatz eines Versuches werden wir Kulturen verwenden, die sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, d.h. Kulturen, die nicht länger als 4 Tage nach der letzten Passage gewachsen sind.

Um festzustellen, bei welcher Ausgangszellzahl die

Zellen die größte Wachstumsrate entfalten, haben wir 5 Wochen lang das Wachstumsverhalten verschiedener Zellkonzentrationen der Osteosarkomzellinien SAOS-2 und TE-85 beobachtet (Abb. 4).

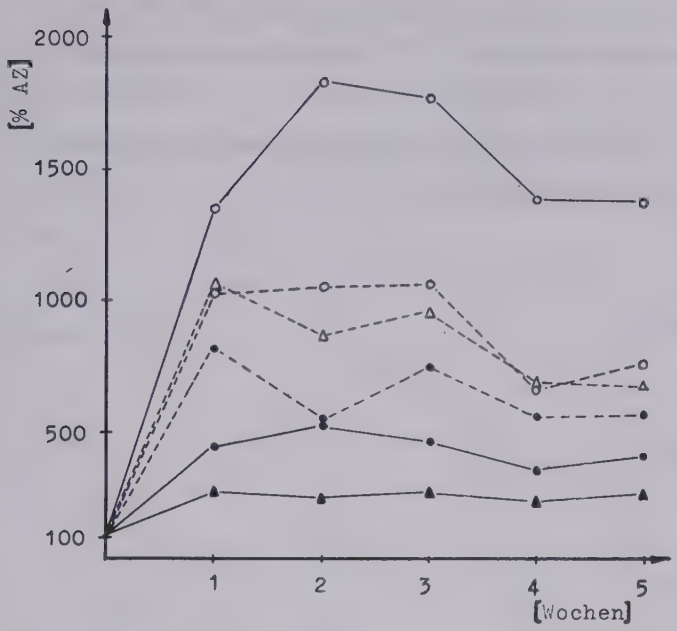

Abb. 4: Wachstumsverhalten der Zellen bei verschiedenen Ausgangszellkonzentrationen

----- SAOS-2
——— TE-85

—o— $2{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/ml
—Δ— $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml
—•— $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml
—▲— $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml

AZ: Ausgangszellzahl

Die Wachstumsrate ist bei niedereren Zellkonzentrationen größer als bei hoher Zelldichte.

Es fällt auf, daß die Zellinie TE-85 in der niedrigen

Zellkonzentration $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml stärker wächst als die Zellinie SAOS-2. In der relativ hohen Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml hat überraschenderweise die Zellinie SAOS-2 eine höhere Wachstumsrate als die Zellinie TE-85.

Unsere Untersuchungen führen wir sowohl mit einer Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml als auch mit einer von $2,5 \cdot 10^5$ Z/ml durch, um die Interferonwirkung unter günstigen und weniger günstigen Wachstumsbedingungen auszutesten.

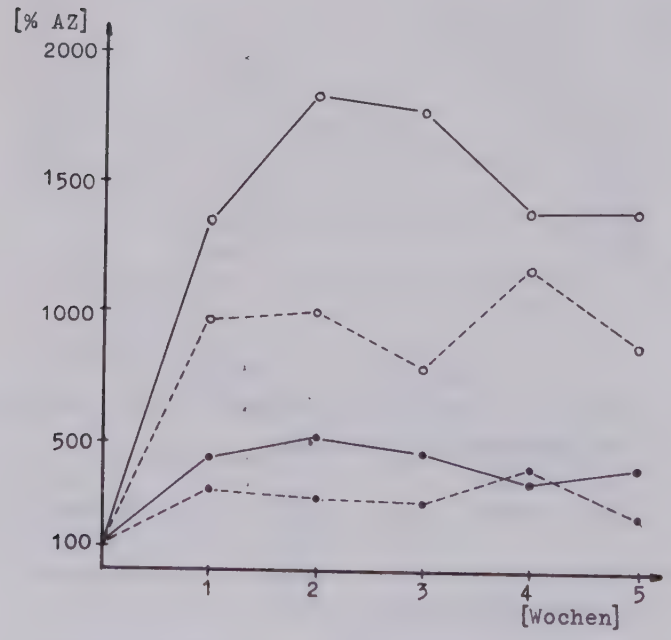

Abb. 5: Einfluß zweier verschiedener Konzentrationen von FKS auf das Wachstumsverhalten der Zellinie TE-85

—•— $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml ——— 10% FKS

—∘— $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml ----- 5% FKS

Einfluß der Konzentration von foetalem Kälberserum (FKS):

In der Literatur werden widersprüchliche Ergebnisse über die optimale Konzentration von FKS angegeben. Daher haben wir die Zellinie TE-85 bei Zusatz von 5% oder 10% FKS zum Medium gezüchtet. Abb. 5 zeigt, daß sich die Wachstumsrate bei 10% MEM gegenüber 5% MEM sowohl bei $2{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/ml als auch bei $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml annähernd auf das Doppelte steigern läßt. Daher haben wir für unsere Versuche nur Medium mit Zusatz von 10% FKS benützt.

Wachstum in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Mediumwechsels:

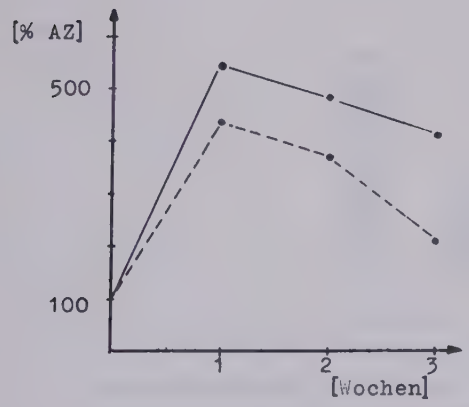

Abb. 6: Wachstumsverhalten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Mediumwechsels

------ Mediumwechsel einmal pro Woche

——— Mediumwechsel alle 2 Tage

Dazu vergleichen wir das Wachstum der Zellinie SAOS-2 während 3 Wochen mit und ohne Mediumwechsel. Die Zellen werden jede Woche in der Ausgangszellzahl $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml angesetzt. In der einen Versuchsreihe wird zusätzlich alle 2 Tage das Medium gewechselt. Abb. 6 zeigt, daß die Zellen, deren Medium alle 2 Tage gewechselt wird, besser wachsen als die Zellen ohne Mediumwechsel.
Auch die Zuverlässigkeit der Werte, d.h. die Regelmäßigkeit des Wachstums der Zellen, ist beim Versuch mit Mediumwechsel alle 2 Tage größer, was sich in einer geringeren Standardabweichung der Meßwerte ausdrückt (Abb. 7).

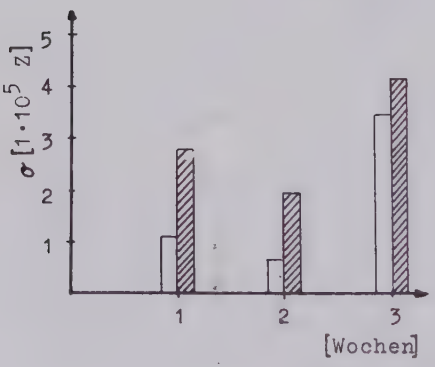

Abb. 7: Standardabweichung (σ) der Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Mediumwechsels

Mediumwechsel alle 2 Tage
Mediumwechsel einmal pro Woche

Wir ziehen daraus die Konsequenz, spätestens nach

4 Tagen einen Mediumwechsel vorzunehmen. Häufiger kann das Medium nicht gewechselt werden, da das Interferon mindestens 4 Tage auf die Zellen einwirken soll. Zudem steigt die Infektionsgefahr mit jeder Manipulation an den Monolayerplatten.
Wir erhalten jetzt eine durchschnittliche Standardabweichung von $2{,}026 \cdot 10^5$ Zellen gegenüber $1{,}732 \cdot 10^5$ Zellen bei der Versuchsreihe mit Mediumwechsel alle 2 Tage und $2{,}963 \cdot 10^5$ Zellen bei der Versuchsreihe mit wöchentlichem Mediumwechsel.

1.4. Fehlerquellen

Um die Aussagekraft der Meßwerte bewerten zu können, ist es notwendig, die Fehlerquellen im Versuchsablauf zu betrachten. Grundsätzlich gilt, daß im Arbeitsablauf möglichst viele Prozesse parallel unter standardisierten Bedingungen ablaufen.

1.4.1. Zellwachstum

Es ist nicht ohne Bedeutung, wie hoch die Passagezahl einer Zellkultur beim Versuchsansatz ist, da die Zellinien desto unempfindlicher gegen Interferon sind, je höher ihre Passagezahl ist[2].
Die Wachstumsrate der Zellen ist abhängig vom Zeitpunkt nach der letzten Passage, zu dem die Zellen in die Meßreihe genommen werden, d.h. von der Wachstumsphase, in der sich die meisten Zellen beim Ansatz befinden (siehe 1.3.).
Wachstumsmedium (MEM mit Earle's Salzen) und foetales Kälberserum hat uns die Fa. RENTSCHLER zur Verfügung gestellt, die beide Nährlösungen ständig auf ihre Qualität hin testet. Die Güte des foetalen Kälberserums wechselt dennoch sehr stark und führt so zu Wachstumsschwankungen.
Die Brutschrankbedingungen sind mit 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit praktisch konstant. Die Zellen werden beim Ansetzen und Auswerten der Versuche so kurz wie möglich außerhalb des Brutschranks gehalten.
Erschütterungen müssen vermieden werden, um ein

gleichmäßiges Wiederanwachsen des Zellrasens zu gewährleisten.

1.4.2. Meßfehler

Die Zellen müssen nach der Trypsinierung ausreichend suspendiert werden, um eine Verklumpung und damit fehlerhafte Zählung im Coulter Counter zu vermeiden. Verunreinigungen im Medium oder in der Zellsuspension werden ebenfalls mitgezählt.
Der Coulter Counter hat die höchste Meßgenauigkeit bei Zellkonzentrationen von 10^5 - 10^6 Zellen/ml. Bei geringeren Zellzahlen können sich Fehler ergeben.

1.4.3. Interferon

Beim Herstellen der Interferonverdünnungen vermeiden wir erhebliche Pipettierfehler, indem wir große Mengen verdünnen, diese in kleinen Portionen gebrauchsfertig abfüllen und bei -90°C einfrieren.
Das Absinken der Interferonaktivität bei der Lagerung kontrollieren wir, indem wir regelmäßig Proben entnehmen und die Interferonaktivität in allen Konzentrationsstufen bestimmen.

1.4.4. Pipettierfehler

Pipettierfehler ergeben sich bei:

- Verdünnen der Zellsuspension
- Zellzählung im Coulter Counter
- Interferonverdünnung
- Interferonzugabe

2. ERGEBNISSE

2.1. Art der Darstellung der Ergebnisse

2.1.1. Kurve der absoluten Wachstumsraten ("Absolutes Wachstum")

Die absolute Wachstumsrate ist definiert als Quotient aus der Zellzahl, die nach einer Woche Wachstum gemessen wird, und der Ausgangszellzahl, multipliziert mit 100:

$$W\ \%\ (10^x\ E\ IFN) := \frac{\text{Zellzahl nach 1 Woche Wachstum } (10^x\ E)}{\text{Ausgangszellzahl}} \cdot 100$$

$(x=1,\ldots,4)$

Die Ausgangszellzahl, also die Zellzahl im Zeitpunkt 0 (Woche 0), wird demgemäß mit 100% angegeben.
Am Anfang jeder neuen Woche $(1,\ldots,5)$ wird die Ausgangszellzahl der Zellkultur wieder angesetzt, am Ende der Woche die Zellzahl gemessen und daraus die Wachstumsrate errechnet.
Die Kurve der absoluten Wachstumsrate macht eine Aussage über das Wachstum der Tumorzellen in vitro während einer Periode von 5 Wochen unter relativ konstanten Bedingungen, einmal als Kontrollwachstum ohne Interferonzusatz und bei Zugabe verschiedener Interferonkonzentrationen.
Die Kontrollkurve nimmt einen zyklischen Verlauf, d.h., höhere Wachstumsraten stehen mit niedrigen Wachstumsraten im Wechsel, was vermutlich dadurch

zustande kommt, daß sich die Anzahl der Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, antizyklisch verhält. Bei hoher Zellkonzentration sind also weniger Zellen teilungsfähig als bei niedriger. Unter Interferoneinfluß wird dieser Zyklus auf niedrigerem Niveau imitiert, was einer Verlangsamung der Zellteilung gleichkommt. Einzig bei der Interferonkonzentration 10^4 E/ml ist der zyklische Verlauf des Zellwachstums aufgehoben. Hier scheinen zytotoxische Effekte eine wichtige Rolle zu spielen.

2.1.2. Kurve der relativen Wachstumsraten ("relatives Wachstum")

Die absoluten Wachstumsraten unter Einfluß der verschiedenen Interferonkonzentrationen werden in Relation gesetzt zur Wachstumsrate der Kontrolle und in % ausgedrückt:

$$W\ \text{rel.}\ \%\ (10^x\ \text{E IFN}) := \frac{W\ \%\ (10^x\ \text{E IFN})}{W\ \%\ (\text{Kontrolle})} \cdot 100$$

Der Kurvenverlauf macht eine Aussage über die Dynamik der wachstumshemmenden Interferonwirkung. Diese setzt nicht sofort voll ein, sondern kann nach einer Latenz von 3 Tagen festgestellt werden, wenn die normale Proliferation der Zellen meßbar wird. Nach Ablauf einer Woche ist schon eine deutliche Wirkung des Interferons in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration ablesbar. Das Maximum der Interferonwirkung liegt zwischen der 2. und 4. Woche.
Es ist auffällig, daß die relative Wachstumsrate der

mit Interferon behandelten Zellen in der 5. Woche ansteigt. Dieses Phänomen wird dadurch verursacht, daß die Zellen der Kontrollgruppe über 5 Wochen die höchsten Wachstumsraten aufweisen, jedoch relativ gesehen die schlechtesten Wachstumsbedingungen haben, da das Verhältnis Medium/Zelle in der Kontrollgruppe am geringsten ist. Es befinden sich also weniger Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, so daß die Wachstumsrate der Kontrolle am Schluß absinkt. Das Ganze wird durch den zyklischen Verlauf der Wachstumskurve überlagert.

Eine Toleranzentwicklung gegenüber Interferon wäre denkbar, ist jedoch unwahrscheinlich, da das Phänomen unabhängig von der Höhe der Interferonkonzentration beobachtet wird, und Wachstumsraten unter Interferoneinfluß, die höher als das Kontrollwachstum sind, die gleiche Tendenz zum Absinken zeigen.

Aus den Werten W rel. % von Woche 1 bis Woche 5 können wir das arithmetische Mittel D bestimmen und erhalten so ein Charakteristikum, das uns erlaubt, die Zellinien bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Interferonkonzentrationen zu vergleichen.

Wir werden später sehen, daß dieser Wert in Einklang steht mit der Charakteristik des relativen iterativen Wachstums nach 5 Wochen M_5 rel.. Wenn wir D auf 5 Wochen anwenden, d.h. D in 5. Potenz (D^5), so gilt: $D^5 \approx M_5$ rel.

Wir teilen die Interferonwirkung bei einer Standardabweichung von durchschnittlich 15% halbquantitativ in Klassen ein:

schwache Wirkung : $41\% \leq W$ rel. $\% \leq 85\%$

gute Wirkung : $20\% \leq W$ rel. $\% \leq 40\%$

sehr gute Wirkung: W rel. $\% < 20\%$

2.1.3. Kurve der iterativen Wachstumsraten ("iteratives Wachstum")

Wir multiplizieren die Wachstumsraten über 5 Wochen auf und simulieren so den Wachstumsverlauf in vivo unter guten, konstanten Bedingungen, wobei die Interferondosis entsprechend der Tumorvergrößerung gesteigert werden müßte, so daß nur Wachstumshemmungen in die Nähe der Ausgangszellzahl, einem steady state oder darunter, eine realistische therapeutische Konstellation ergeben.
In Bezug auf die Kombination von Interferon mit Zytostatika ist eine Wachstumshemmung durch Interferon unterhalb des 10fachen der Ausgangszellzahl noch ein diskutables Ergebnis.

$$M_n\ (10^x \text{ E IFN}) := \sum_{\nu=1}^{n} W_\nu\ (10^x \text{ E IFN})$$

$(n,\nu = 1,\ldots,5$ Wochen$)$; $(x = 1,\ldots,4)$,

wobei W_ν die Wachstumsrate in der νten Woche ist, und die Ausgangszellzahl auf 1 normiert ist.
Der Unterschied zwischen den Wirkungen der einzelnen Interferonkonzentrationen einerseits und den

zwei Interferonen andererseits ist bei dieser Darstellungsart gut ablesbar.
Die Wirkung niedriger Interferonkonzentrationen, die in den wöchentlichen Wachstumsraten nicht deutlich werden, ist am Ende der Behandlung anhand dieser Kurve gut zu erkennen.
Der zyklische Verlauf der wöchentlichen Wachstumsraten nivelliert sich durch die halblogarithmische Darstellung. Er ist in einer leichten Schwankung um eine gedachte Gerade noch zu erkennen, in seiner Bedeutung für den gesamten Wachstumsverlauf der Zellen jedoch eindeutig relativiert.

2.1.4. Kurve der relativen iterativen Wachstumsraten ("relatives iteratives Wachstum")

Sie bringt keine wesentliche neue Information.
Der gesamte Wachstumsverlauf unter Interferoneinfluß relativ zum Kontrollwachstum wird deutlich.
Dadurch schaffen wir das Charakteristikum M_n rel.:

$$M_n \text{ rel. } (10^x \text{ E IFN}) := \frac{M_n\ (10^x \text{ E IFN})}{M_n\ (\text{Kontrolle})} \quad ; \; n = 1,\ldots,5 \text{ Wochen}$$

Es dient zum Vergleich der Tumoren untereinander.
M_n rel. beschreibt den Verlauf der Interferonwirkung und erlaubt so einen genaueren Vergleich der Zellen untereinander als das Charakteristikum D der relativen Wochenwachstumsraten ($D^5 \approx M_5$ rel.).
Gut sichtbar wird auch der Unterschied der Wirkung beider Interferone.

2.1.5. Zeichenerklärung

Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration:

—•— 0 E/ml IFN = Kontrolle

—o— 10^1 E/ml IFN

—▲— 10^2 E/ml IFN

—Δ— 10^3 E/ml IFN

—x— 10^4 E/ml IFN

Ordinaten:

W = absolute Wachstumsrate

W rel. = relative Wachstumsrate

M_n = iterative Wachstumsrate

M_n rel. = relative iterative Wachstumsrate

Einheiten:

[% AZ] = Angabe der absoluten Wachstumsrate in % der Ausgangszellzahl

[% K] = Angabe der relativen Wachstumsrate in % der Wachstumsrate der Kontrolle

[VF] = Angabe der iterativen Wachstumsrate als Vielfaches der Ausgangszellzahl, wobei die Ausgangszellzahl auf 1 normiert ist

[% K_i] = Angabe der relativen iterativen Wachstumsrate in % der Iteration der Kontrolle

t = Zeit

[Wo] = Wochen

2.2. Analyse des Wachstums der einzelnen Zellinien unter Interferoneinfluß

2.2.1. Fibroblasten

2.2.1.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml

Die Fibroblasten als nicht maligne Zellen haben erwartungsgemäß eine niedrige Proliferationsrate, die maximal bei 300% der Ausgangszellzahl liegt (Abb. 8,9).
Eine deutliche wachstumshemmende Wirkung ist nur bei 10^4 E/ml IFN-β mit durchschnittlich 60% der Kontrolle zu bemerken, alle anderen Werte liegen oberhalb 80% des Kontrollwerts und sind so nicht mehr signifikant (Abb. 10,11). Es könnte sein, daß die Wirkung dieser hohen Interferonkonzentration nicht durch das Interferon selbst, sondern durch Fremdstoffe verursacht wird (siehe 2.4.).
Das iterative Wachstum der Kontrolle ist 100fach in 5 Wochen, das in Gegenwart von 10^4 E/ml IFN-β 6fach, das von 10^4 E/ml IFN-α 40fach (Abb. 12,13).

2.2.1.2. Ausgangszellzahl: $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

Das Wachstum der Fibroblasten unter diesen guten Bedingungen ist im Gegensatz zur Beobachtung bei der Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml erheblich gesteigert. Es liegt mit einer maximalen absoluten Wachstumsrate von 1100% in der dritten Woche auf dem Niveau der Osteosarkomzellinie SAOS-2 (Abb. 14,15).

Dies führen wir auf die günstigen Wachstumsbedingungen und die fehlende Kontakthemmung bei dieser geringen Zelldichte zurück.
Die mit IFN-β in den Konzentrationen 10^3 und 10^4 E/ml behandelten Zellen zeigen eine deutliche Wachstumshemmung auf 60% bzw. 25% des Kontrollwachstums (Abb. 16). 10^4 E/ml IFN-α bewirken eine durchschnittliche Wachstumshemmung auf 45% des Kontrollwerts (Abb. 17). Die iterative Wachstumsrate beträgt in der 5. Woche das 30000 - 40000fache der Ausgangszellzahl. Bei Behandlung der Zellen mit 10^4 E/ml IFN-α wird sie auf das 400fache, bei Behandlung mit 10^4 E/ml IFN-β auf das 20fache reduziert (Abb. 18,19).

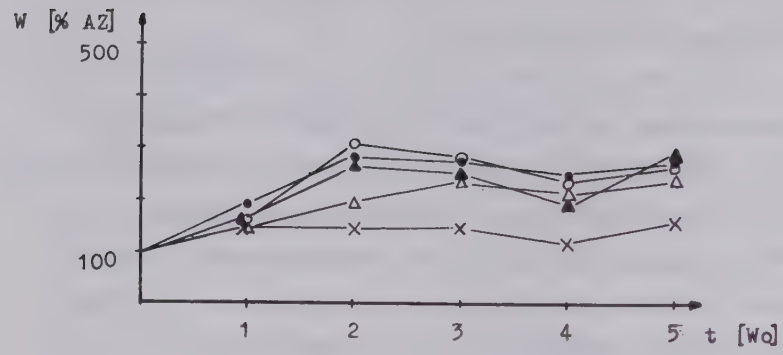

Abb. 8: Absolute Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

Abb. 9: Absolute Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

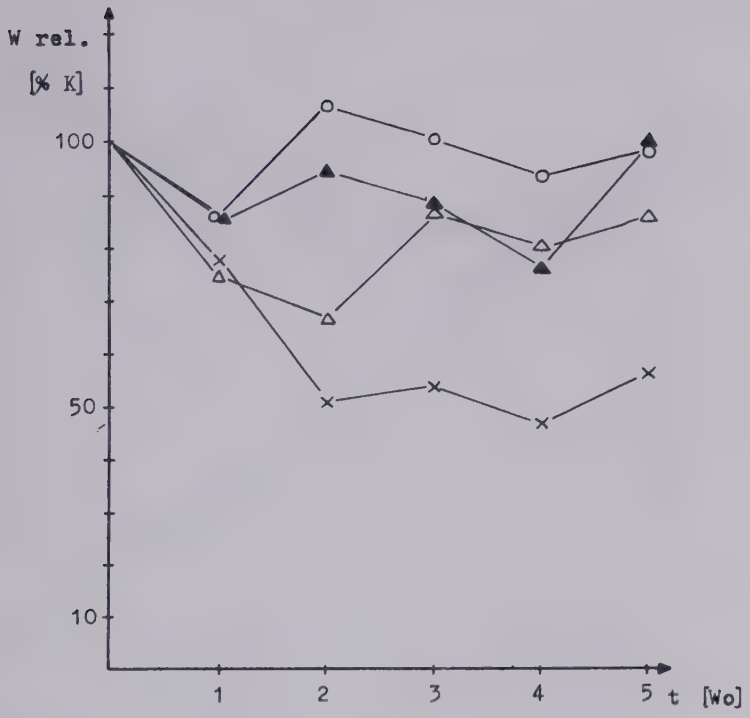

Abb. 10: Relative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

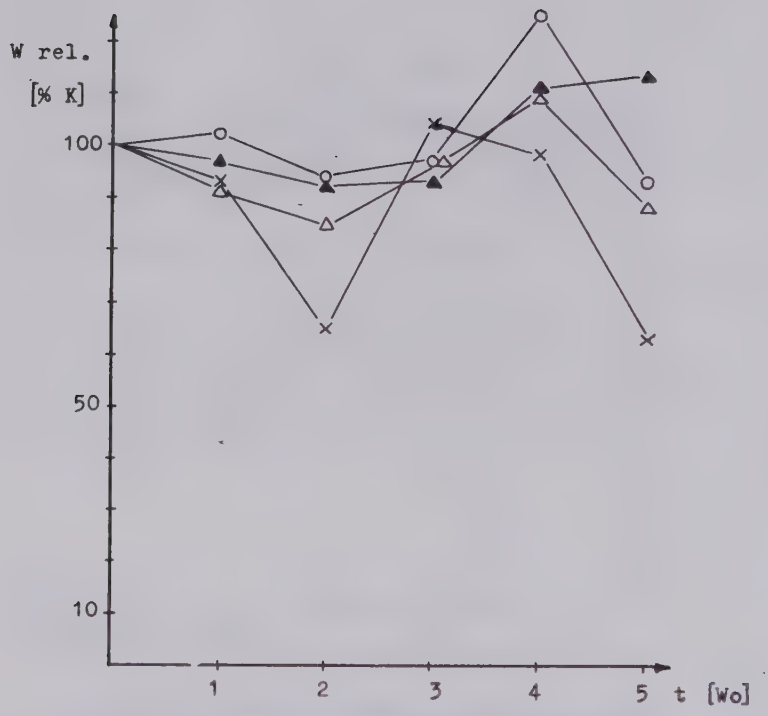

Abb. 11: Relative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

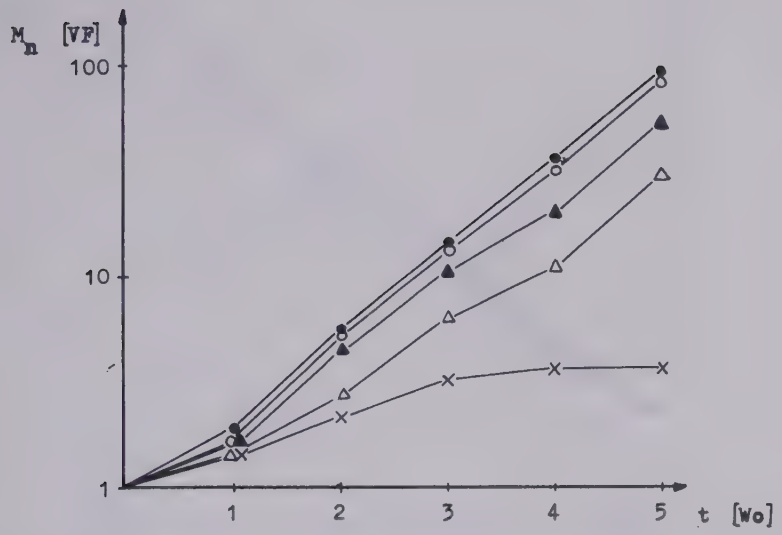

Abb. 12: Iterative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

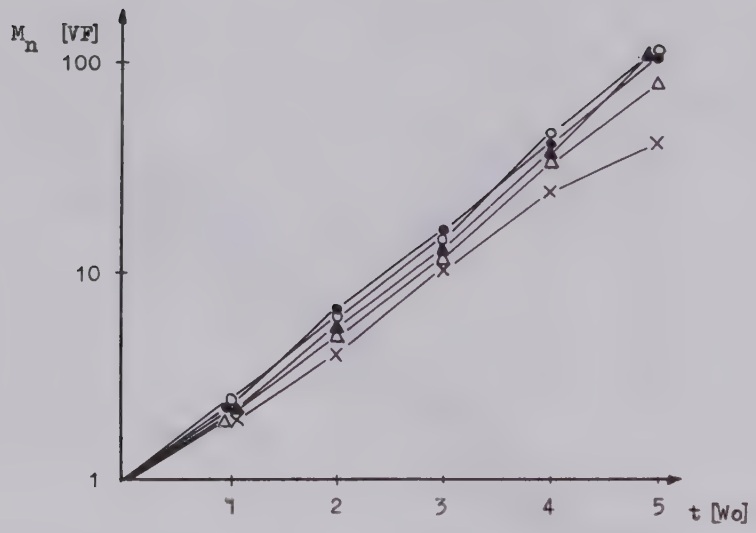

Abb. 13: Iterative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN- (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von 1 10^5 Z/ml

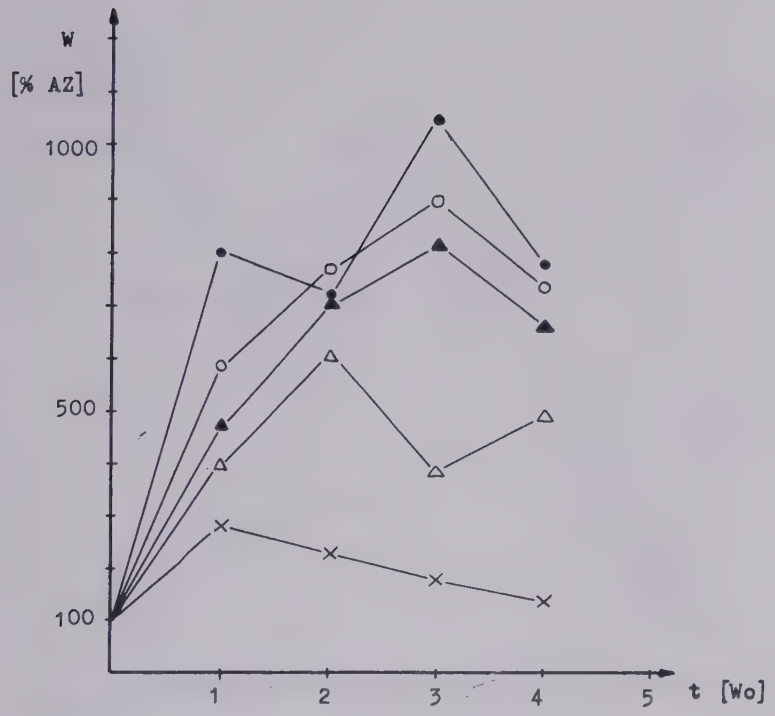

Abb. 14: Absolute Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 4 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

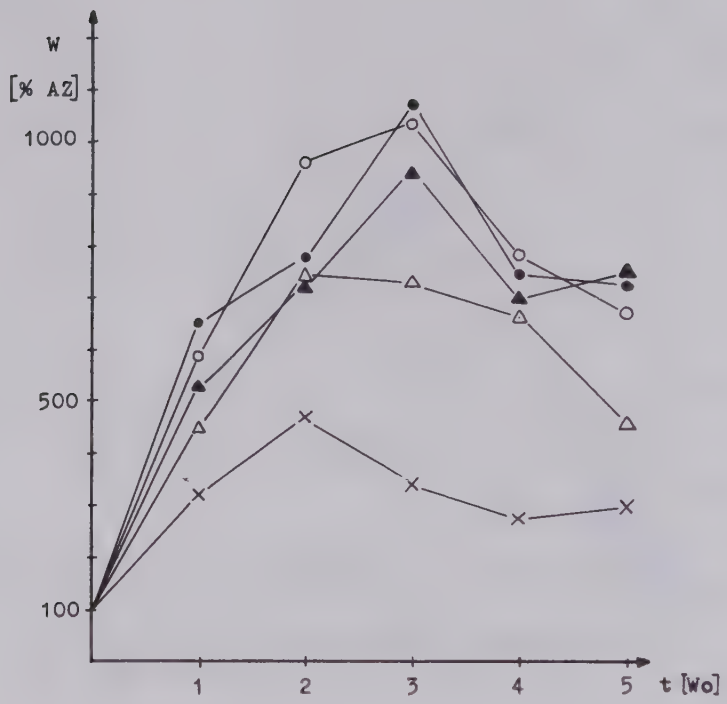

Abb. 15: Absolute Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

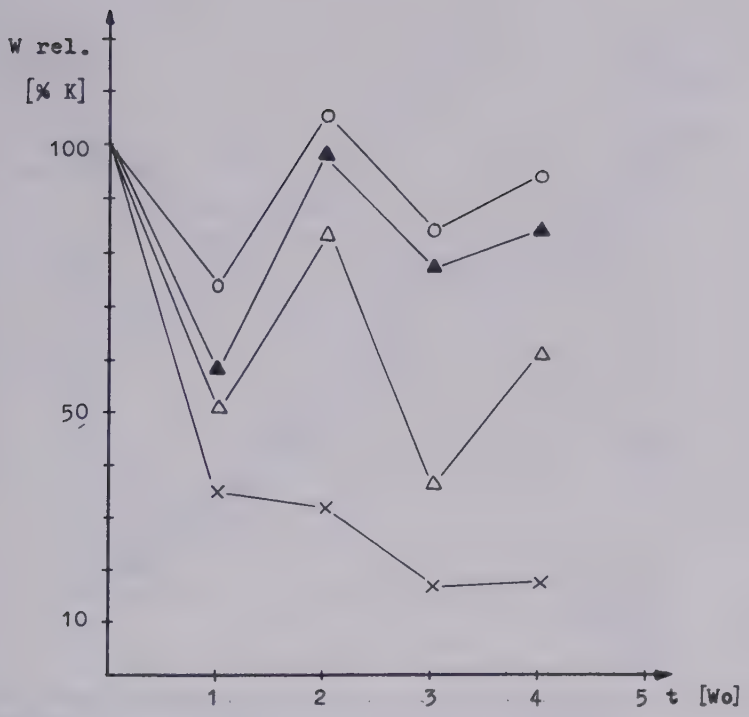

Abb. 16: Relative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 4 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

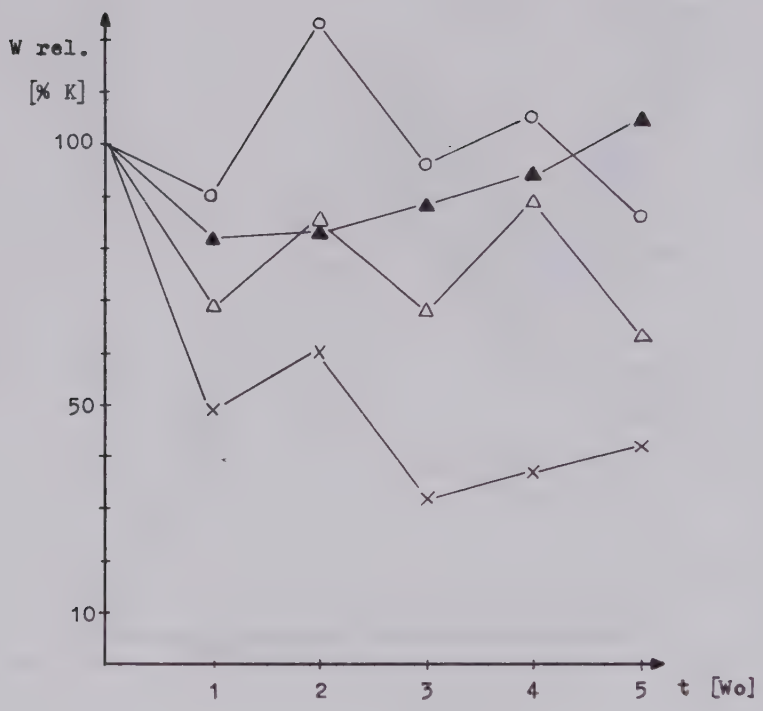

Abb. 17: Relative Wachstumsrate der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

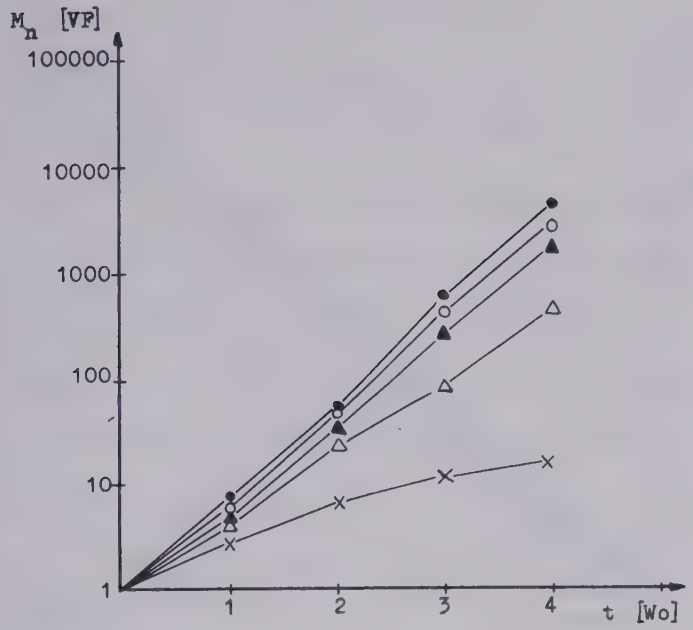

Abb. 18: Iteratives Wachstum der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) über 4 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

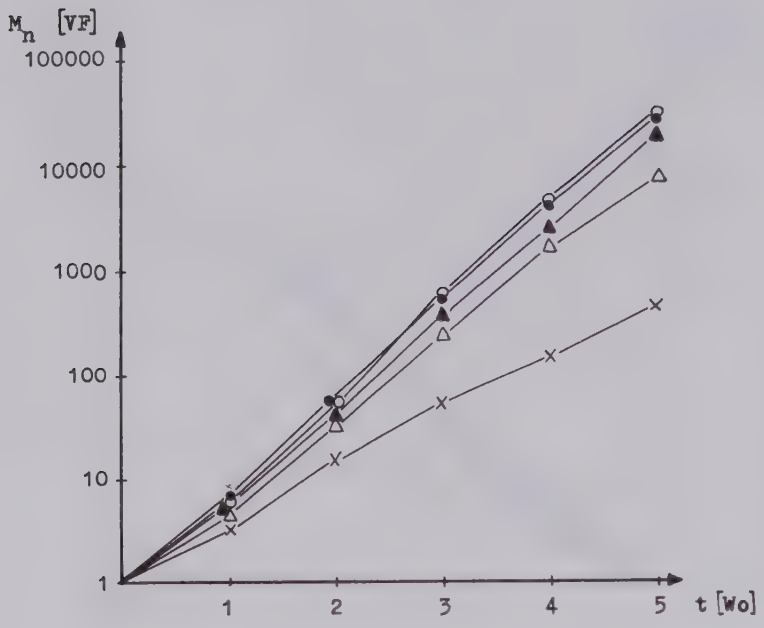

Abb. 19: Iteratives Wachstum der Fibroblasten in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) über 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

2.2.5. Rhabdomyosarkom CCL 136

2.2.5.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml

Die Wachstumsrate der Kontrolle ist in der dritten Woche mit 1200% Ausgangszellzahl maximal (Abb. 52, 53).

Die mit 10^1 - 10^3 E/ml IFN-β oder IFN-α behandelten Zellen werden in ihrem Wachstum kaum gehemmt, ihre Wachstumsrate gleicht sich der Wachstumsrate der Kontrolle bis zur fünften Woche nahezu an (Abb. 54,55). Nur 10^4 E/ml IFN-β bewirken eine Reduktion der Wachstumsrate auf durchschnittlich 40% des Kontrollwachstums (Abb. 54).

Die Iteration über 5 Wochen M_5 beträgt 30000 - 40000 für die Kontrolle, für 10^4 E/ml IFN-β immer noch 500, man kann hier also nicht von einem überzeugenden Effekt der Interferone sprechen (Abb. 56,57).

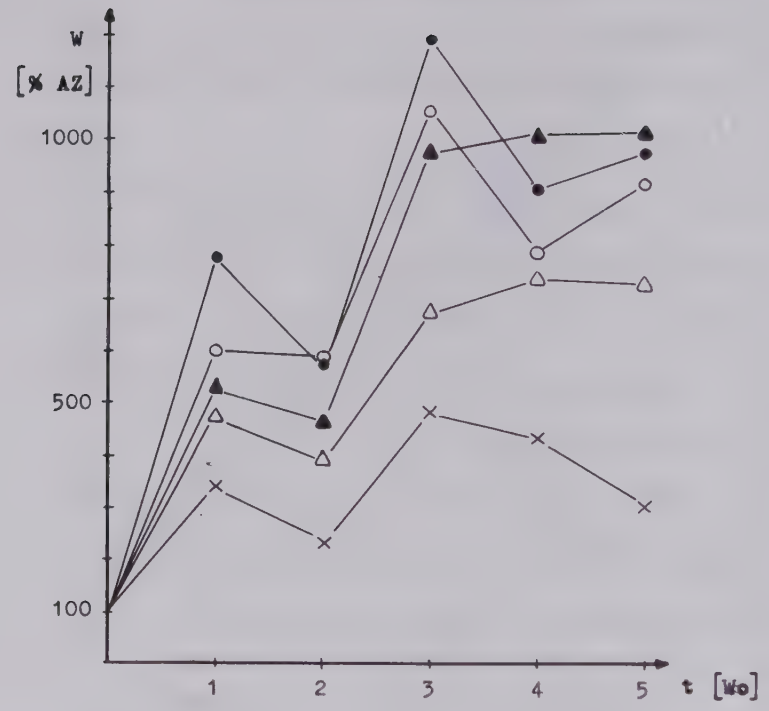

Abb. 52: Absolute Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

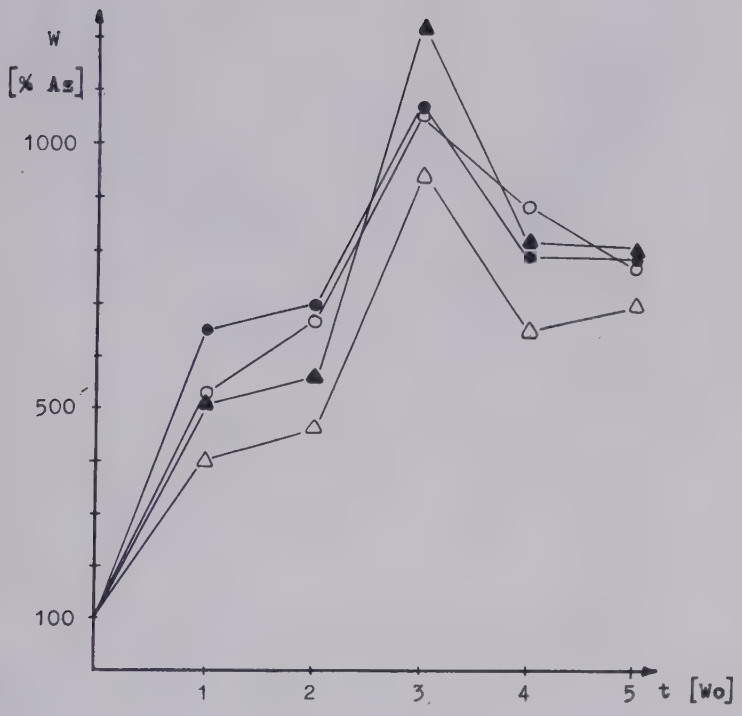

Abb. 53: Absolute Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

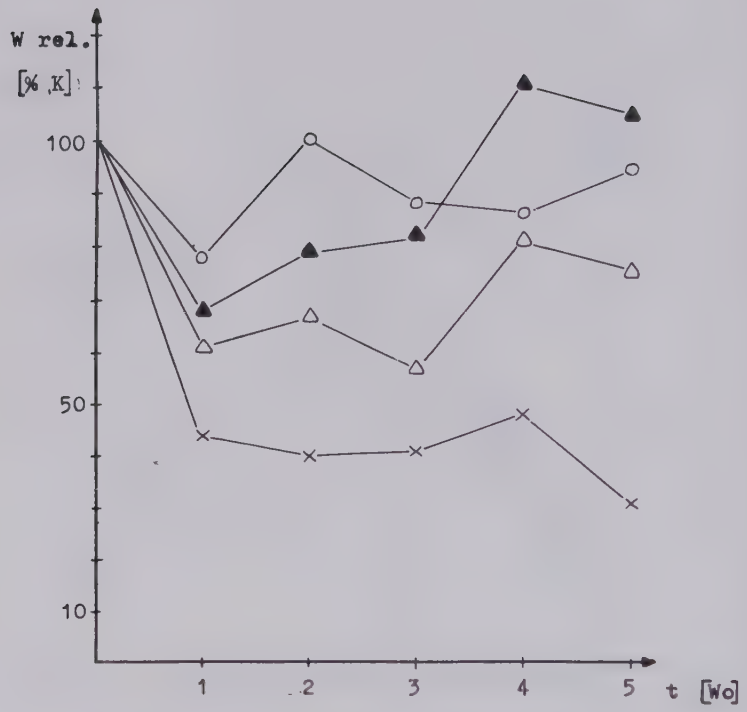

Abb. 54: Relative Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

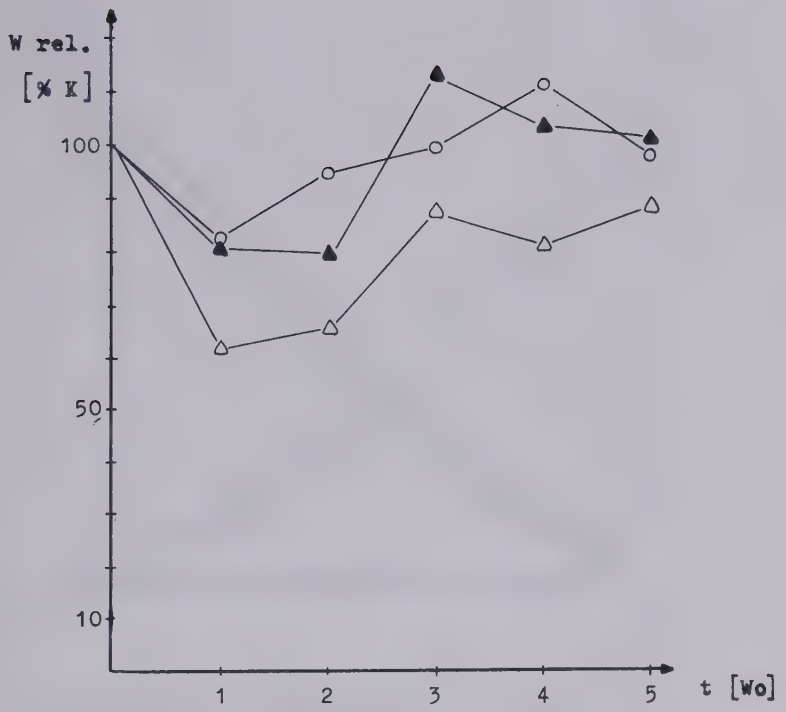

Abb. 55: Relative Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

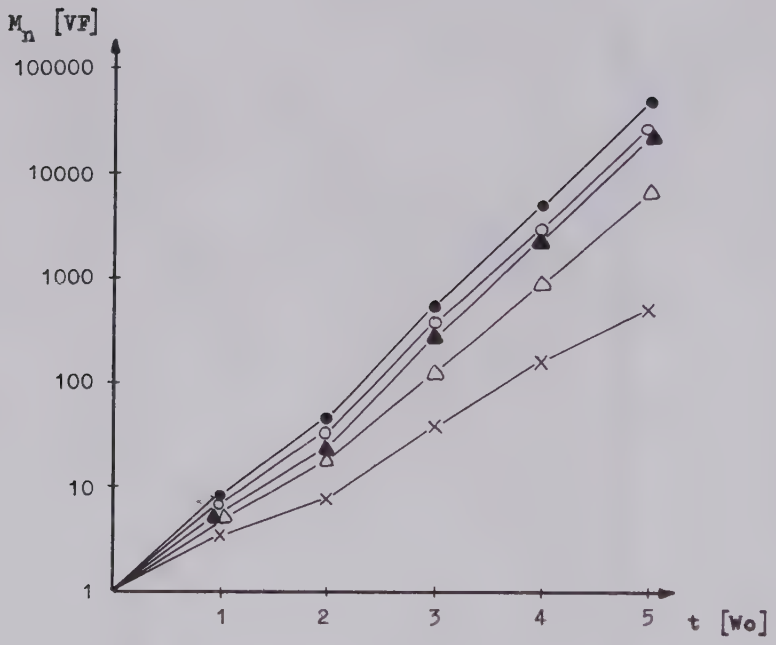

Abb. 56: Iteratives Wachstum von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

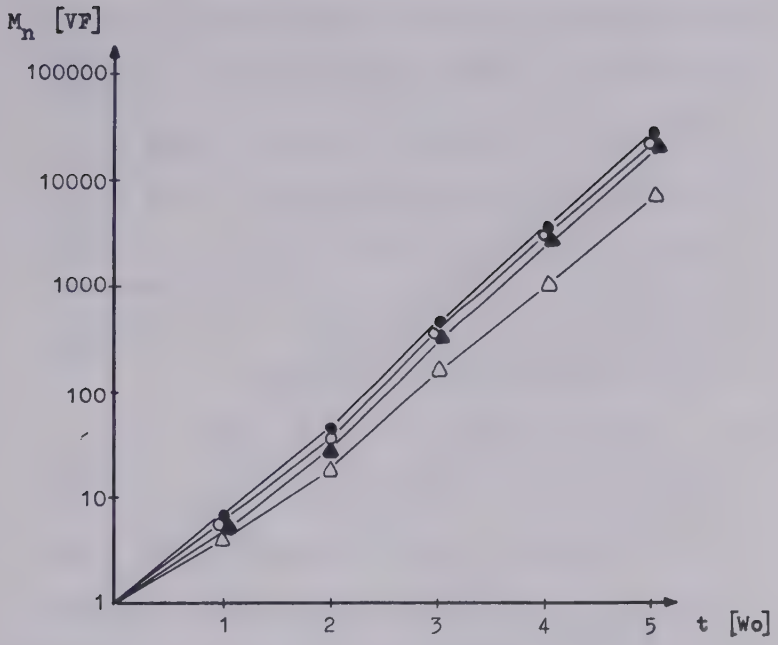

Abb. 57: Iteratives Wachstum von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

2.2.5.2. Ausgangszellzahl: $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml

Das Zellwachstum unter Kontrollbedingungen zeigt eine kontinuierliche, leicht schwankende Steigerung von der ersten bis zur fünften Woche. Die absolute wöchentliche Wachstumsrate steigt von 1000% Ausgangszellzahl in der ersten Woche auf 4000% in der fünften Woche an (Abb. 58,59). Sie liegt bei dieser niedrigen Zellkonzentration und den damit besseren Wachstumsbedingungen um das 4fache höher als bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml.
Auch die zytostatische Wirkung des Interferons kommt hier deutlicher zum Vorschein. So wird das Zellwachstum durch 10^4 E/ml IFN-β und IFN-α auf 10% bzw. 42% des Kontrollwerts gehemmt (Abb. 60,61). Die Iteration über fünf Wochen bestätigt dies. Die mit 10^4 E/ml IFN-β behandelten Zellen sind insgesamt nur auf das 33fache gewachsen, das sind 0,0004% des Kontrollwerts ($M_5 = 6,5 \cdot 10^6$). Die mit 10^4 E/ml IFN-α behandelten Zellen wachsen in fünf Wochen immer noch auf das 10^5fache der Ausgangszellzahl an, während die iterative Wachstumsrate der Kontrolle ungefähr das 10^7fache beträgt; 10^4 E/ml IFN-α haben das Zellwachstum in fünf Wochen somit um 1/100 des Kontrollwerts reduziert (Abb. 62,63)

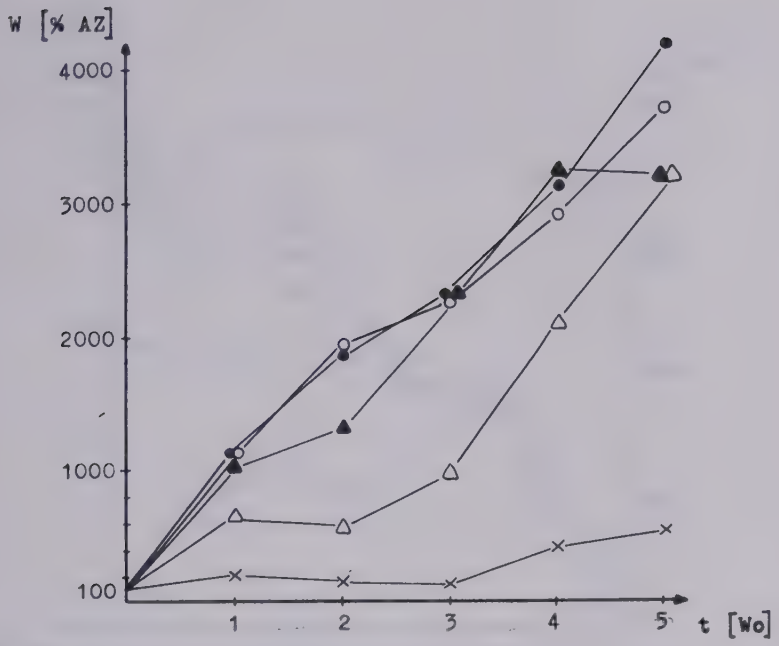

Abb. 58: Absolute Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

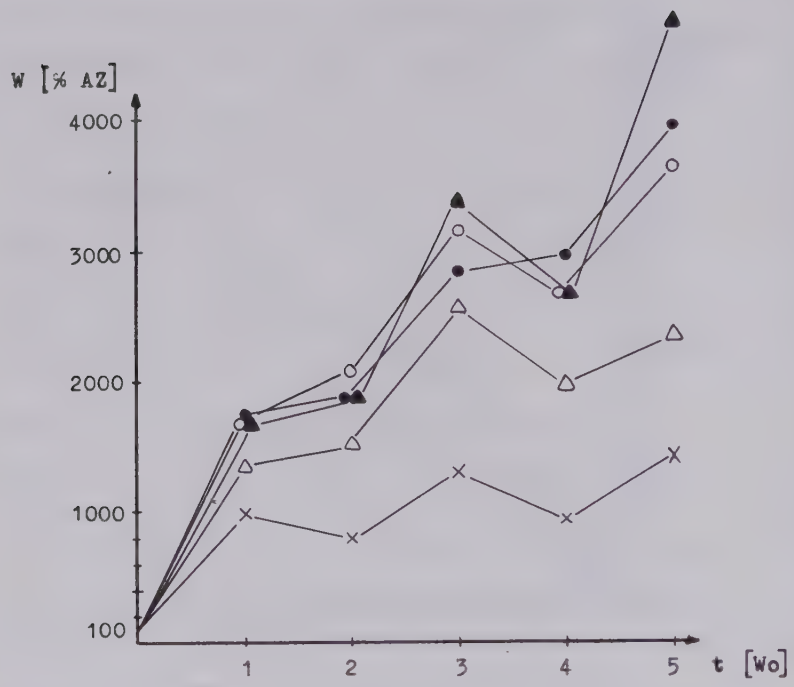

Abb. 59: Absolute Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

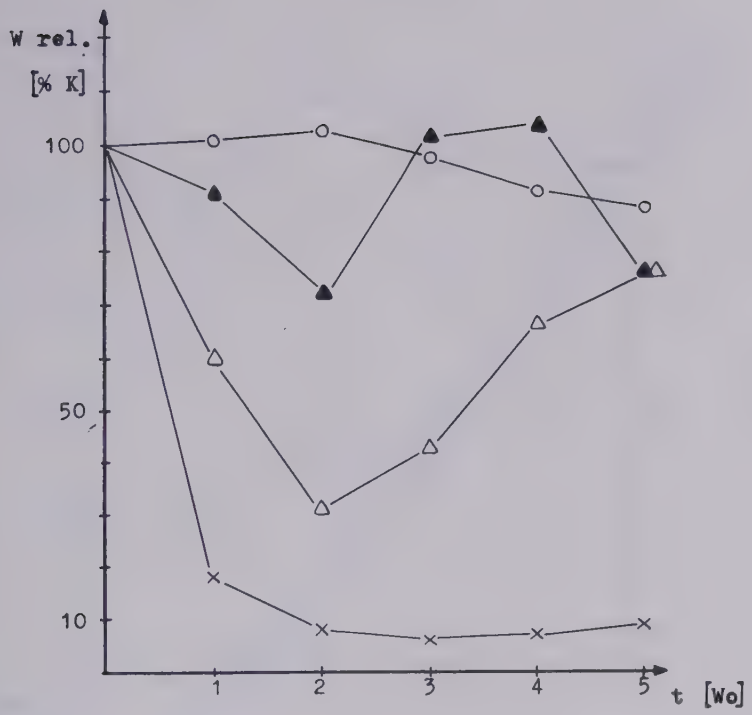

Abb. 60: Relative Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

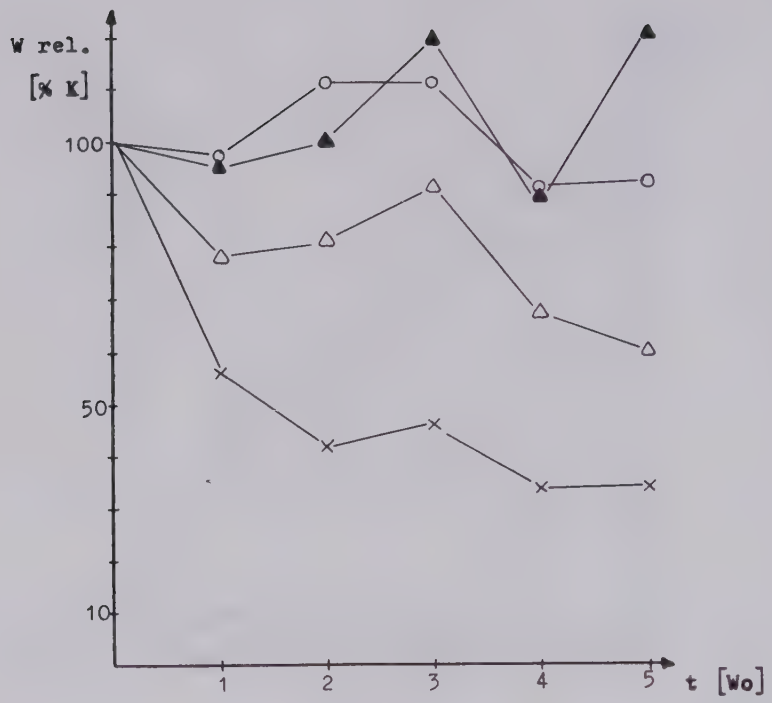

Abb. 61: Relative Wachstumsraten von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

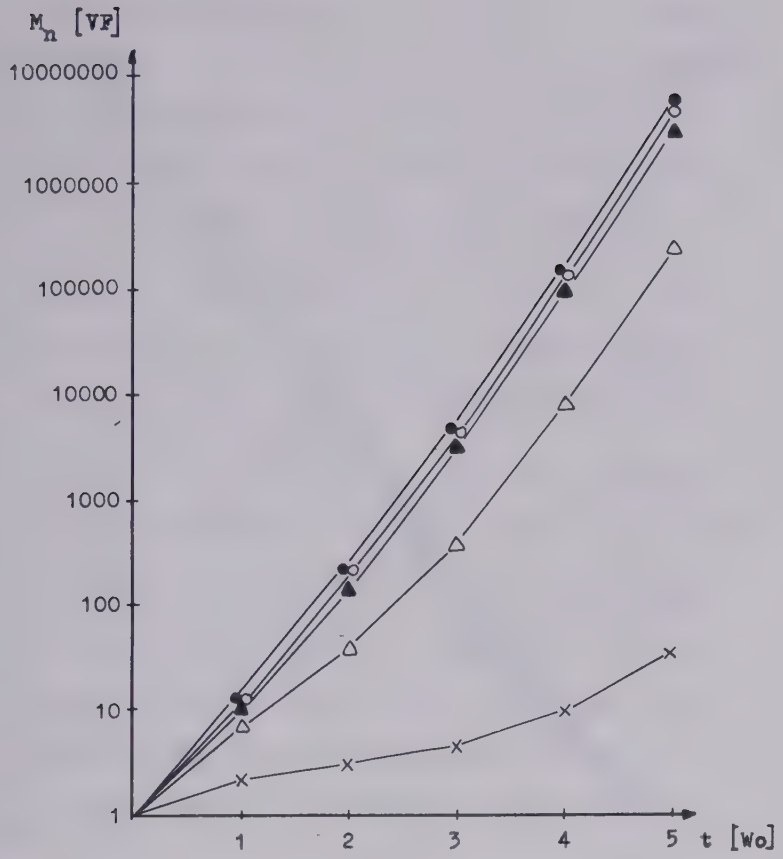

Abb. 62: Iteratives Wachstum von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

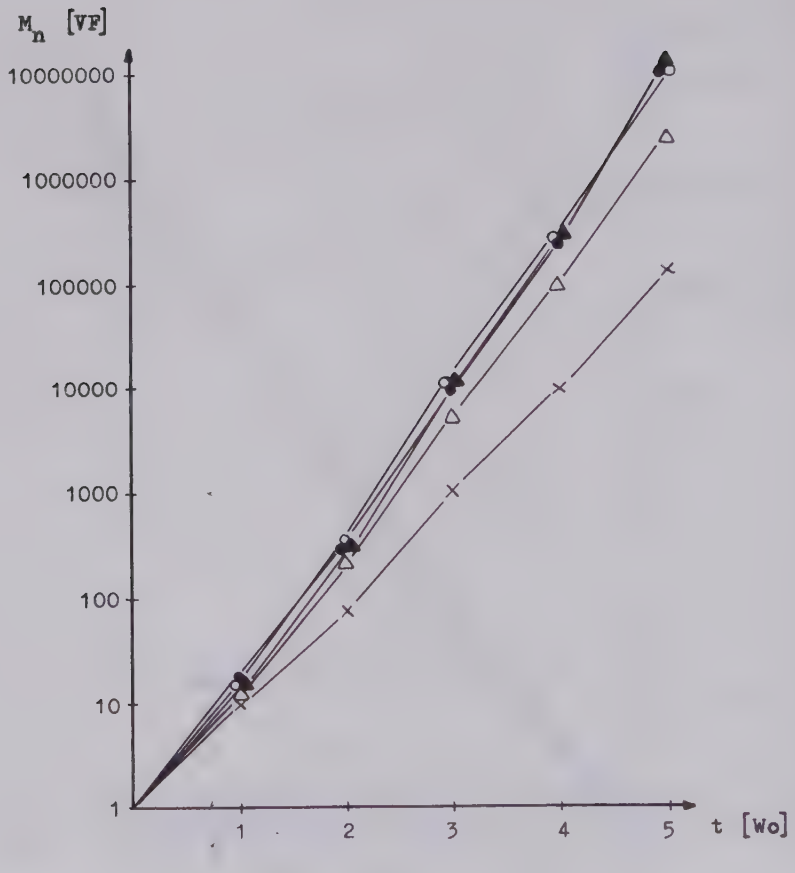

Abb. 63: Iteratives Wachstum von CCL 136 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

2.2.6. Neuroblastom CCL 127

2.2.6.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml

Das Wachstum der Kontrolle ist in der dritten bis vierten Woche maximal mit 1500% der Ausgangszellzahl. In der fünften Woche erfolgt ein Abfall auf ≈800% der Ausgangszellzahl; dieser entspricht dem oben (Kap. 2.2.1.) beschriebenen zyklischen Verlauf des Zellwachstums (Abb. 64,65).
Nur 10^4 E/ml IFN-β bewirken eine eindeutige Reduktion des Zellwachstums auf durchschnittlich 43% des Kontrollwerts (Abb. 66).
Die iterative Wachstumsrate der Kontrolle beträgt nach fünf Wochen 60000 - 120000. Die mit 10^1 - 10^4 E/ml IFN-β oder IFN-α behandelten Zellen wachsen um höchstens 1 Zehnerpotenz schlechter als die Kontrolle.
Nur 10^4 E/ml IFN-β senken das Wachstum um 2 Zehnerpotenzen, die Zellen sind nach fünf Wochen auf 1/100 des Kontrollwerts gewachsen (Abb. 68,69).

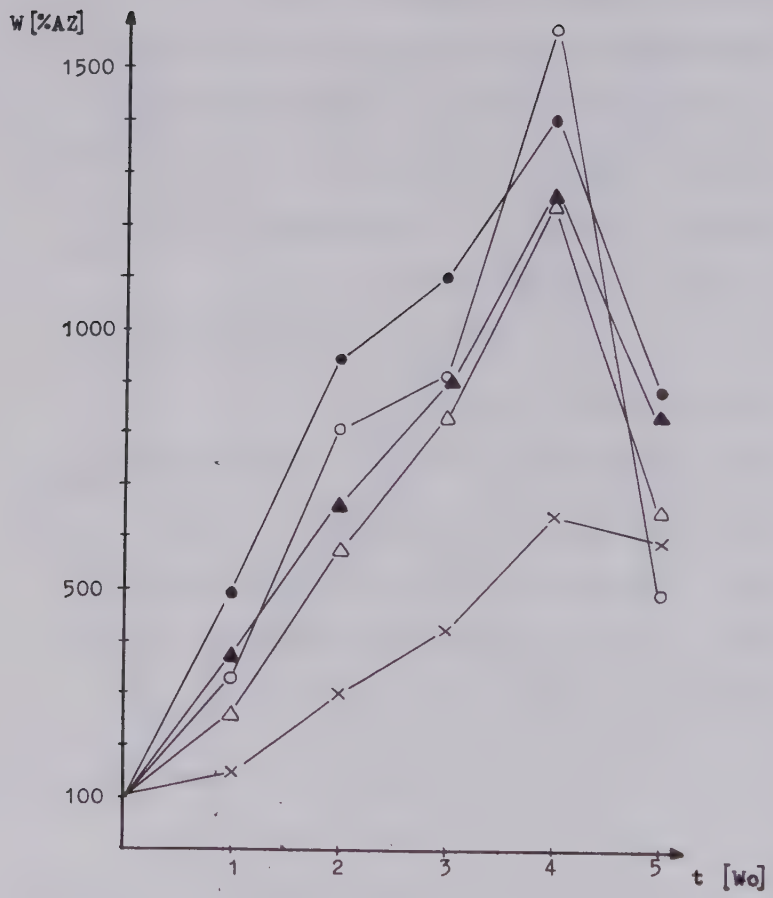

Abb 64: Absolute Wachstumsraten von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

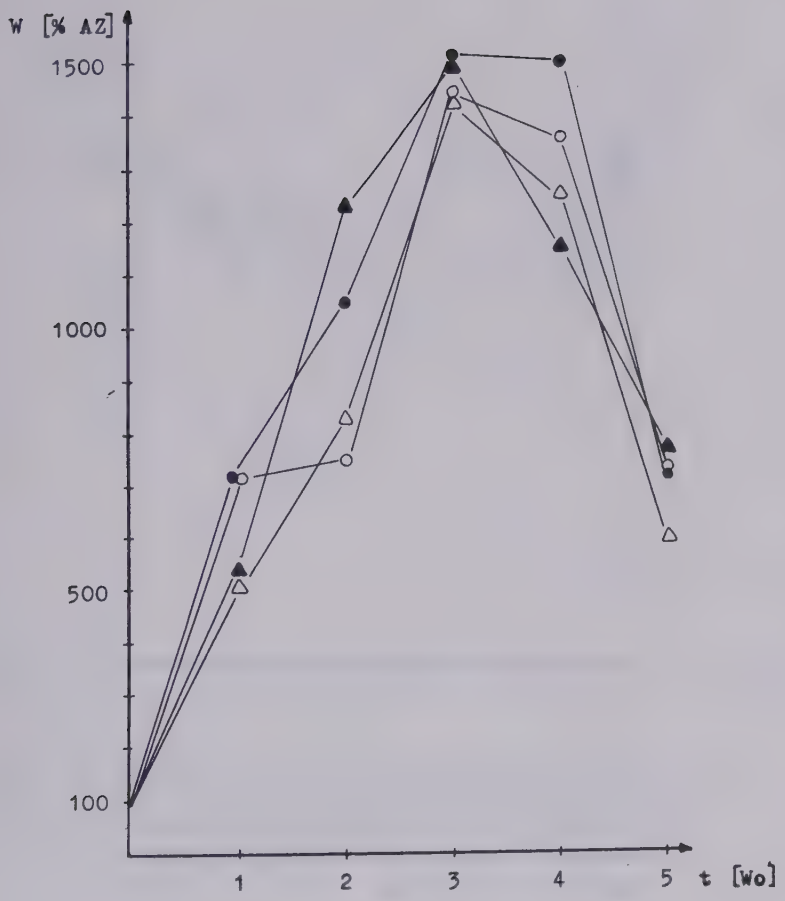

Abb. 65: Absolute Wachstumsraten von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1, 10^2, 10^3 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

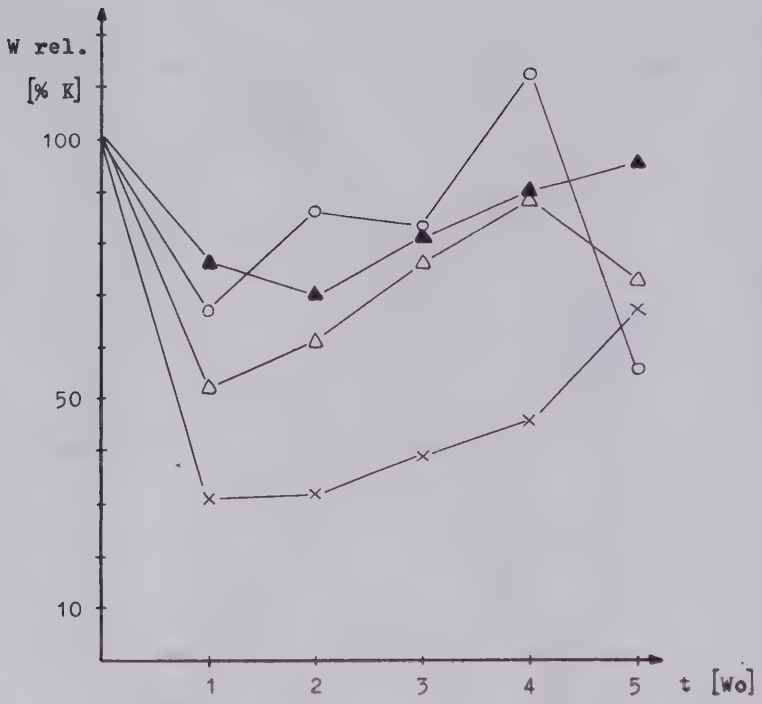

Abb. 66: Relative Wachstumsraten von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

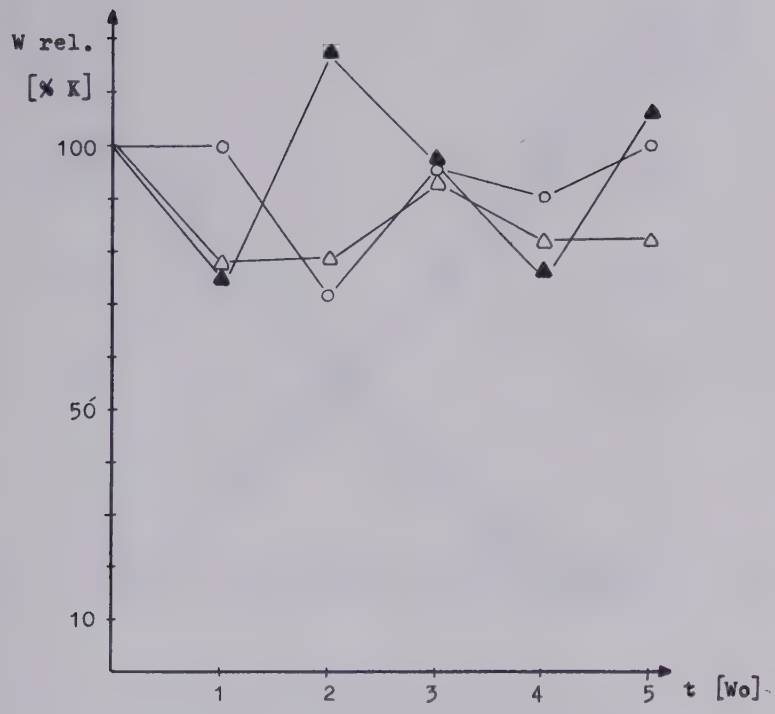

Abb. 67: Relative Wachstumsraten von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-α (10^1, 10^2, 10^3 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

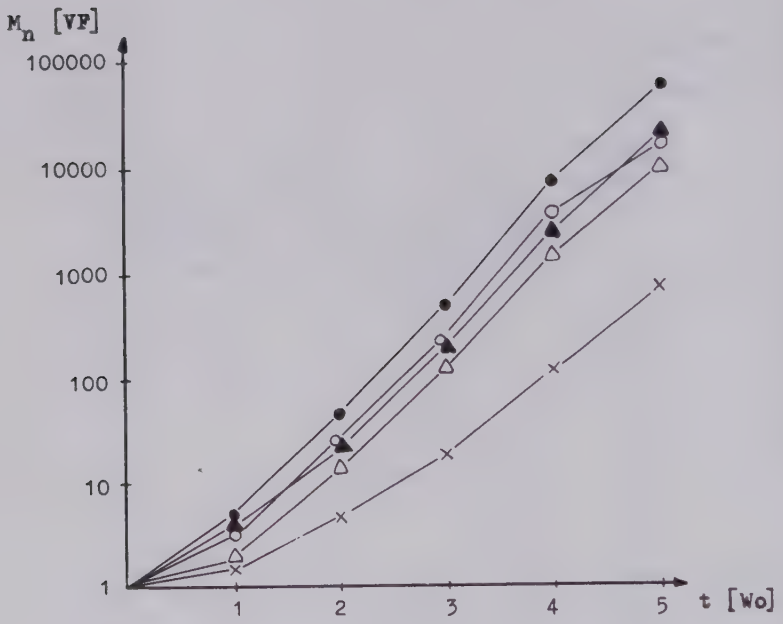

Abb. 68: Iteratives Wachstum von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

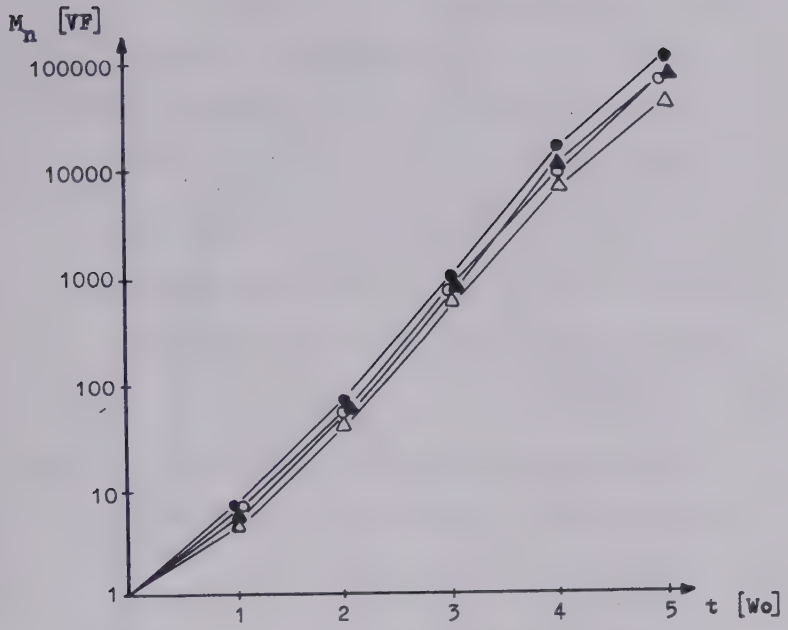

Abb. 69: Iteratives Wachstum von CCL 127 in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1, 10^2, 10^3 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

2.2.7. Neuroblastom SK-N-FI

2.2.7.1. Ausgangszellzahl: $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml

Das Zellwachstum zeigt einen zyklischen Verlauf mit einem Maximum in der dritten Woche mit 1200% der Ausgangszellzahl und einem Abfall der absoluten Wachstumsrate in der fünften Woche auf 300%. Dieses Wachstumsverhalten gleicht dem der anderen Neuroblastomzellinie CCL 127 (2.2.6.): hohe Wachstumsraten und große Zelldichten wirken sich negativ auf das Teilungsverhalten der Zellen aus.
Nur die mit 10^4 E/ml IFN-β oder IFN-α behandelten Zellen wachsen mit einer wöchentlichen Wachstumsrate von durchschnittlich 200% deutlich langsamer als die Kontrolle (Abb. 70,71). Dies drückt sich auch aus in einer relativen Wachstumsrate von 25% bei IFN-β und 30% bei IFN-α (Abb. 72,73).
In der Kurve des iterativen Wachstums erkennen wir, daß das Kontrollwachstum von 20000 - 40000 durch 10^3 E/ml IFN-β auf das 1000fache, von 10^3 E/ml IFN-α auf das 700fache gehemmt wird. 10^4 E/ml IFN-β reduzieren das iterative Wachstum auf das 17fache, 10^4 E/ml IFN-α auf das 27fache (Abb. 74,75).

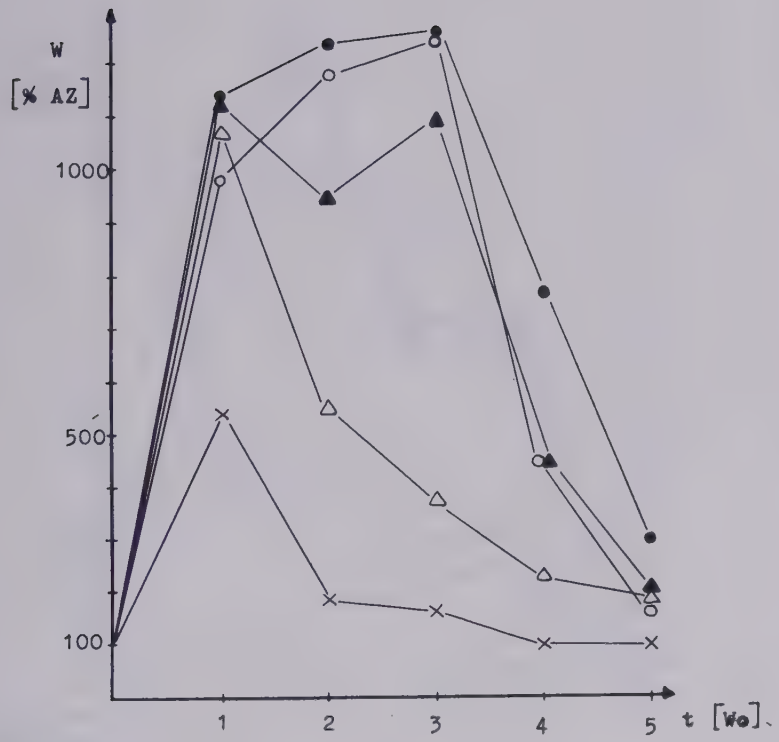

Abb. 70: Absolute Wachstumsraten von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

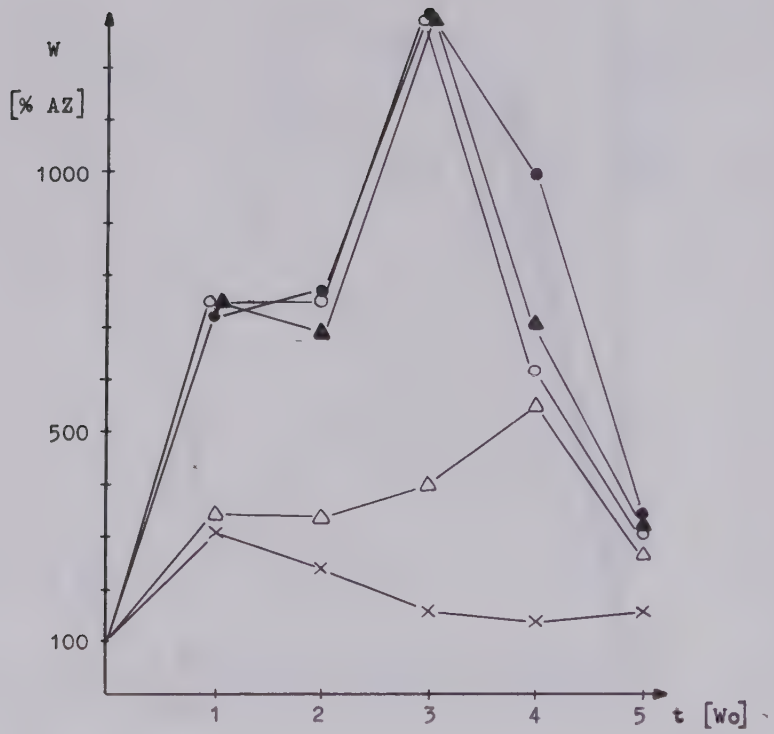

Abb. 71: Absolute Wachstumsraten von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

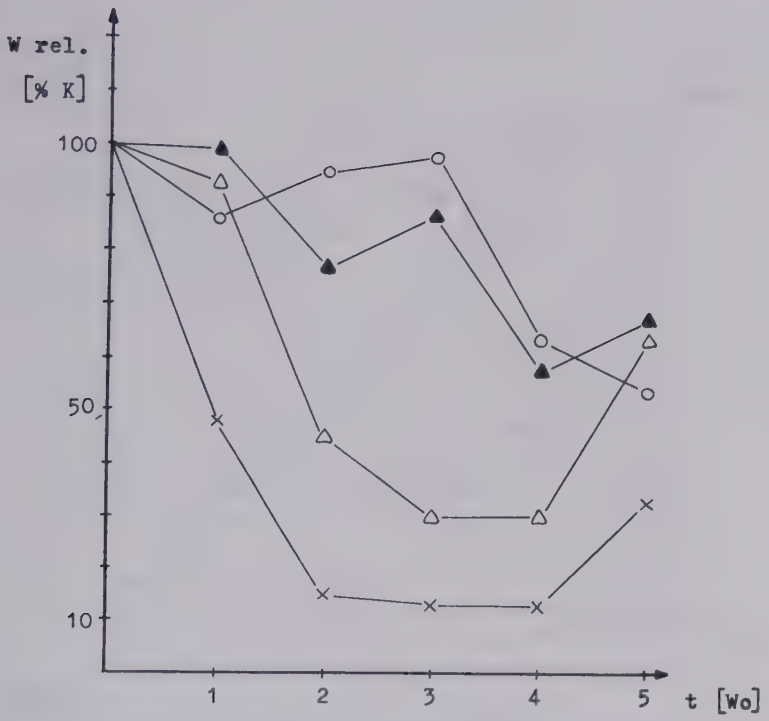

Abb. 72: Relative Wachstumsraten von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

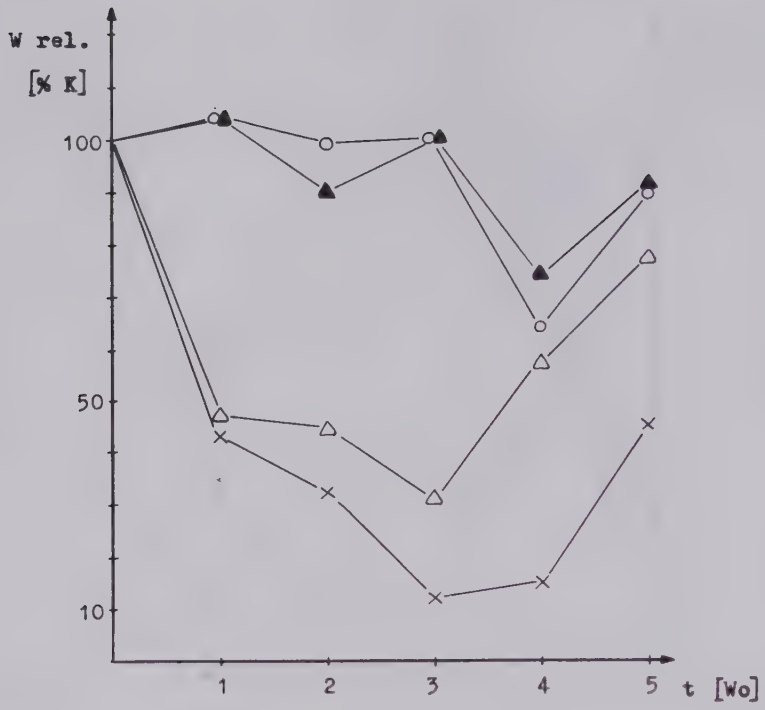

Abb. 73: Relative Wachstumsraten von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

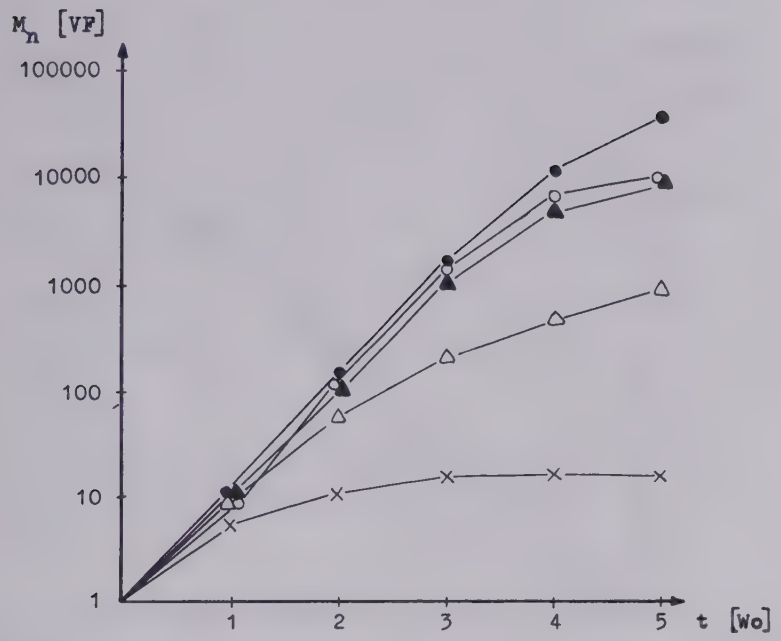

Abb. 74: Iteratives Wachstum von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

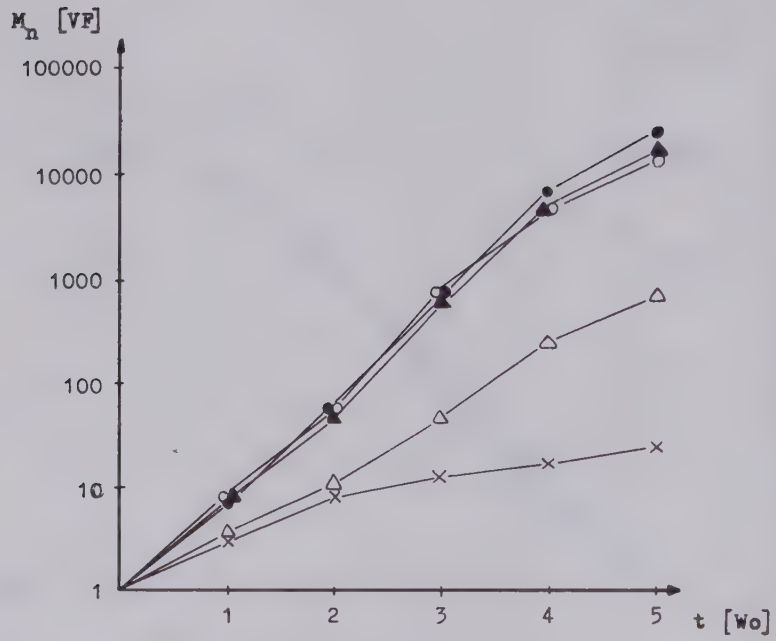

Abb. 75: Iteratives Wachstum von SK-N-FI in Abhängigkeit von IFN-α (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

2.3. Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN-α und IFN-β auf die verschiedenen Zellinien

Zum Vergleich der Interferonwirkung auf das Wachstum der einzelnen Zellinien bedienen wir uns der Charakterisierung durch die relativen iterativen Wachstumsraten nach fünf Wochen M_5 rel. in Abhängigkeit von den Interferonkonzentrationen 10^1 E/ml, 10^2 E/ml, 10^3 E/ml, 10^4 E/ml und der Ausgangszellzahl. Diese Zahlen geben den Wachstumsverlauf am genauesten wieder, da keine Durchschnittswerte in die Rechnung eingehen.
In diesem Kapitel werden auch die Ergebnisse der Arbeit meiner Frau Sabine MAYER-EICHBERGER verwendet[21].

2.3.1. Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml

Fibroblasten, normale menschliche Zellen, zeigen die geringste Proliferationsrate mit einem iterativen Wachstum von ca. 100 in 5 Wochen. Entsprechend fällt auch die Wachstumshemmung bescheiden aus: durch IFN-α reduziert sich das Wachstum auf (108, 103, 76, 39) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml IFN-α bei einer durchschnittlichen wöchentlichen Wachstumsrate W rel. von 85 % der Kontrolle in der höchsten Interferonkonzentration. Also nur 10^4 E/ml IFN-α sind in der Lage, das Zellwachstum effektiv zu hemmen.
Fibroblasteninterferon zeigt einen geringfügig besseren Effekt mit dem Wachstumsspektrum (89, 57,

31, 6) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml IFN-β nach 5 Wochen. Sowohl 10^2 als auch 10^3 E/ml IFN-β bringen somit eine effektive Wachstumshemmung auf 31 bzw. 6 % bei durchschnittlichen relativen wöchentlichen Wachstumsraten von 79 und 58 % der Kontrolle.

Am empfindlichsten reagiert die Osteosarkomzelllinie SAOS-2, die bei einem Proliferationsfaktor von 24000 in 5 Wochen eine Wachstumshemmung auf (16, 0,03, 0,002, 0,0006) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml IFN-β und auf (81, 29, 1, 0,02) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml IFN-α zeigt. Schon 10^2 E/ml IFN- und 10^1 E/ml IFN-β bewirken eine beachtliche Wachstumshemmung bei durchschnittlichen relativen wöchentlichen Wachstumsraten von ca. 75% der Kontrolle. Entsprechend der Erhöhung der Interferonkonzentration steigt die Wachstumshemmung bei 10^4 E/ml IFN-β bezüglich M_5 rel. bis über 1/100000 der Kontrolle und bei 10^4 E/ml IFN-α auf 1/50000 der Kontrolle während 5 Wochen an[21].

Die Osteosarkomzelllinie TE-85 reagiert bei einer relativ niedrigen iterativen 5-Wochen-Wachstumsrate von 500 mit einer Wachstumshemmung von (106, 93,16,2) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml IFN-α; nur 10^3 und 10^4 E/ml IFN-α mit durchschnittlichen relativen wöchentlichen Wachstumsraten von 72 bzw. 45 % der Kontrolle zeigen eine bescheidene

Wirkung. Die Wirkung von IFN-β mit (69, 58, 2, 0) % der Kontrolle in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml ist trotz des relativ geringen Kontrollwachstums erstaunlich. Die durchschnittlichen relativen wöchentlichen Wachstumsraten liegen bei 49% bzw. 7% der Kontrolle bei Behandlung mit 10^3 und 10^4 E/ml IFN-β[21].

Deutlich weniger empfindlich als die Osteosarkomzellinie SAOS-2 mit einer Wachstumsrate von ca. 25000 in 5 Wochen, aber auch schwächer als die Osteosarkomzellinie TE-85 mit einer Wachstumsrate von 500 in 5 Wochen reagieren die Zellinien CCL 136 (Rhabdomyosarkom), CCL 138 (Nasopharynxcarcinom)[21] und CCL 127 (Neuroblastom), die 5-Wochen-Wachstumsraten zwischen 20000 und 100000 erreichen.

Eine Ausnahme macht hier nur die Wirkung von IFN-β auf die Zellinie CCL 138 mit einer Reduktion des Wachstums auf (49, 20, 5, 0,03) % der Kontrolle in 5 Wochen in Abhängigkeit von (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) E/ml[21].

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abbildung 76, 77 übersichtlich dargestellt.

Zellart	W_n max	$\bar{W}_n$	$\bar{W}_n$ rel. 10^1	10^2	10^3	10^4	M_5	$\bar{M}_5$ rel. 10^1	10^2	10^3	10^4
IFN-β			75	17	11	11		16	0,03	0,002	0,0006
SACS-2*	8-9	7,5					24000				
IFN-α			96	79	42	13		81	29	1	0,002
IFN-β			94	102	49	7		69	58	2	0
TE-85*	4,5	3,2					500				
IFN-α			102	101	72	45		106	93	16	2
IFN-β			89	89	68	41		55	51	14	1
CCL 136	11,5	8,4					38000				
IFN-α			98	96	77			87	78	26	
IFN-β			87	78	55	21		49	20	5	0,03
CCL 138*	8,5	7,5					22000				
IFN-α			92	87	85	62		65	54	43	9
IFN-β			81	83	70	43		30	37	16	1
CCL 127	15	10,3					100000				
IFN-α			92	94	83			64	71	40	
IFN-β			98	90	79	58		89	57	31	6
Fibro.	2,8	2,5					100				
IFN-α			102	101	94	85		108	103	76	39

Tabelle 1: Zellinienvergleich; Ausgangszellzahl: $1 \cdot 10^5$ Z/ml

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1984[21]

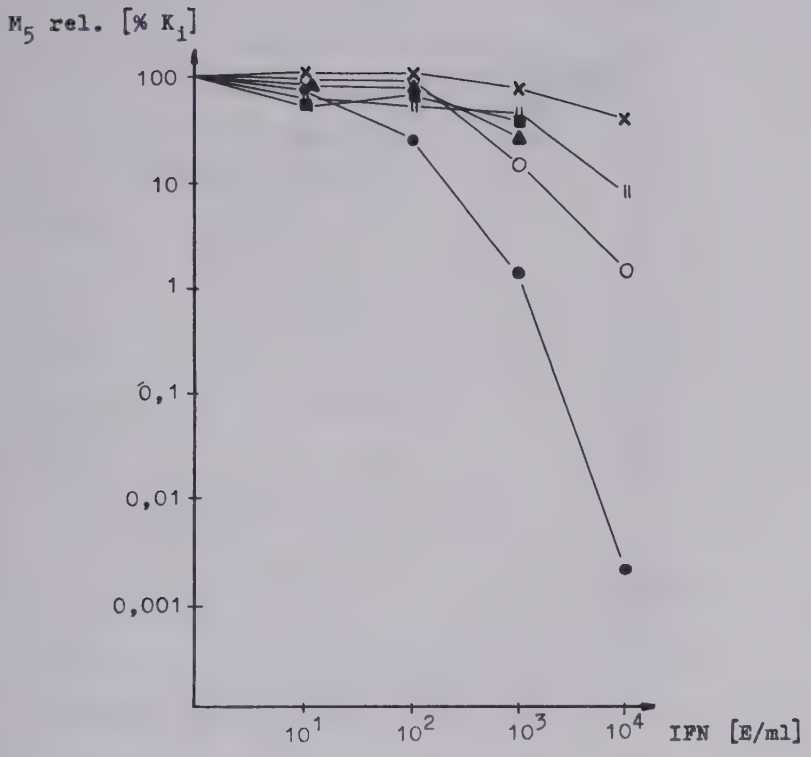

Abb. 76: Vergleich der relativen iterativen Wachstumsraten der verschiedenen Zellinien in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...10^4 E/ml) nach 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

—x— Fibroblasten —■— CCL 127 —▲— CCL 136 —ıı— CCL 138*
—o— TE-85* —●— SAOS-2*

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1984

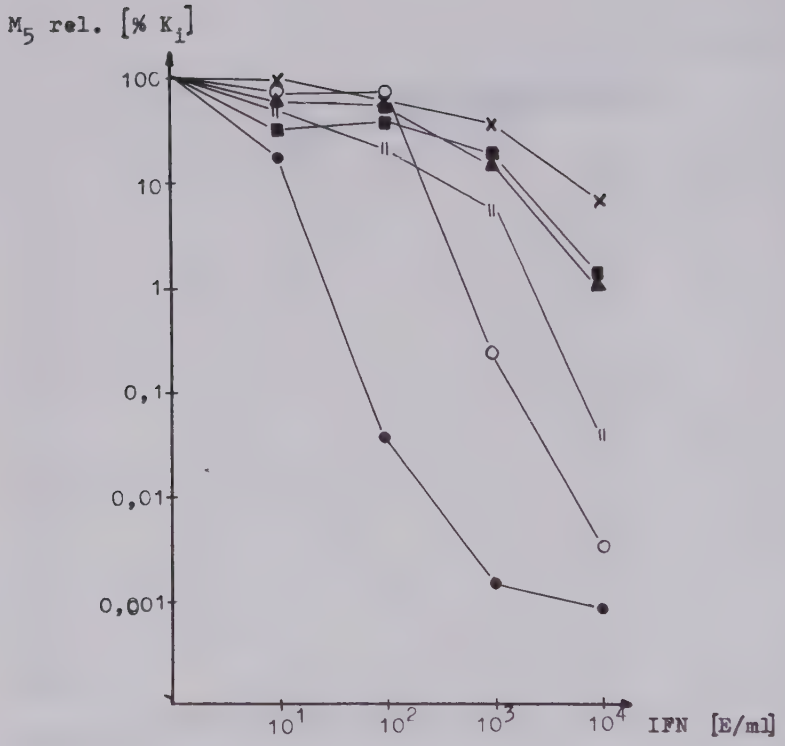

Abb. 77: Vergleich der relativen iterativen Wachstumsraten der verschiedenen Zellinien in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) nach 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

—×— Fibroblasten —■— CCL 127 —▲— CCL 136
—ǁ— CCL 138* —○— TE-85* —●— SAOS-2*

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1987[21]

2.3.2. Ausgangszellzahl: $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml

Generell ist zu sagen, daß bei dieser Ausgangszellzahl die Wachstumsbedingungen viermal besser sind als bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml. Dies läßt sich leicht ablesen an einer bezüglich der einzelnen Zellinien unterschiedlich erhöhten iterativen Wachstumsrate nach 5 Wochen M_5:
Beispiel:

	$2,5 \cdot 10^4$ Z/ml	$1 \cdot 10^5$ Z/ml
SAOS-2*	35000	24000
CCL 136	10000000	38000
Fibroblasten	34000	100

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1988[21]

SAOS-2 mit einer 1 1/2 fachen Wachstumssteigerung ist also weniger abhängig von diesen Bedingungen als die Fibroblasten und die Rhabdomyosarkomzellinie CCL 136, bei der sich die Zellen in der niedrigeren Ausgangszellzahl ungefähr 30mal häufiger teilen. Zudem arbeiten wir bei der niedrigen Ausgangszellzahl mit einer 4mal höheren Interferonkonzentration pro ausgesäate Zelle.
Fibroblasten werden jetzt schon durch 10^3 E/ml IFN-α auf 25% der Kontrolle in 4 Wochen reduziert bei einer durchschnittlichen relativen wöchentlichen Wachstumsrate von 77%. 10^2 E/ml IFN-β bewirken eine deutliche Wachstumshemmung nach 5 Wochen auf 6,3% der Kontrolle.

Die Zellinie SAOS-2 des Osteogenen Sarkoms zeigt auch bei diesem Vergleich das beste Wirkungsspektrum. Die Behandlung mit 10^4 E/ml IFN-α und 10^3 E/ml IFN-β führt zu einem völligen Verschwinden der Zellen nach 4 - 5 Wochen[21].

Die Osteosarkomzellinie TE-85[21] und die Neuroblastomzellinie SK-N-FI werden in der Konzentrationsstufe 10^1 E/ml IFN-α oder IFN-β in ihrem Wachstum gehemmt. Nur die Rhabdomyosarkomzellinie CCL 136 mit ihrer massiven Wachstumsrate zeigt bei 10^1 E/ml IFN-β und 10^1 - 10^2 E/ml IFN-α keine signifikante Wirkung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 und Abbildung 78, 79 zusammengefaßt.

IFN-β ist in allen Konzentrationen und bei allen Zellinien stärker wirksam als IFN-α, doch der Unterschied ist nicht ganz so groß wie in den Versuchen mit der Ausgangszellzahl $1 \cdot 10^5$ Z/ml.

Zellart	W_n max	$\bar{W}_n$	$\bar{W}_n$ rel. % 10^1	10^2	10^3	10^4	M_5	M_5 rel. % 10^1	10^2	10^3	10^4
IFN-β			71	39	10	8		19	1	0	0
SAOS-2*	13	8,3					35000				
IFN-α			78	84	27	11		26	40	0,1	0
IFN-β			72	69	23	16		18	16	0,04	0,006
TE-85*	14,5	11					110000				
IFN-α			85	100	48	24		41	91	1	0,06
IFN-β			97	89	56	10		83	54	4	0,0004
CCL 136	42	26					10000000				
IFN-α			100	105	75	42		100	123	23	1
IFN-β			79	78	43	24		28	27	2	0,02
SK-N-FI	13	8,8					30000				
IFN-α			91	92	51	29		58	62	3	0,1
IFN-β			90	80	58	26		60	33	6,3	0,6
Fibro.	10,5	8					34000				
IFN-α			100	94	77	44		105	65	25	2

Tabelle 2: Zellinienvergleich
Ausgangszellzahl: $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1984[21]

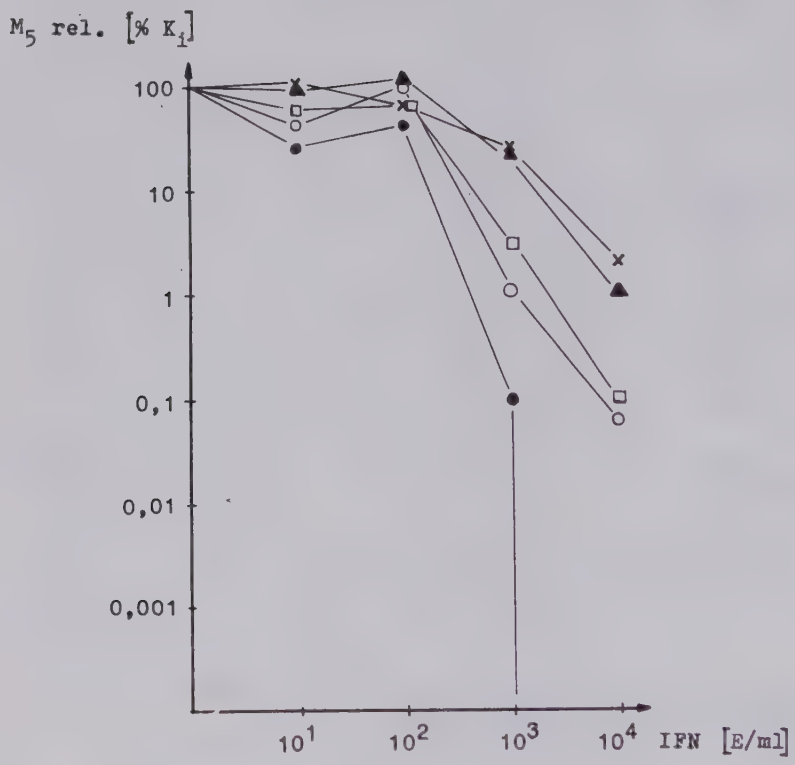

Abb. 78: Vergleich der relativen iterativen Wachstumsraten der verschiedenen Zellinien in Abhängigkeit von IFN-α (10^1,...,10^4 E/ml) nach 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

—x— Fibroblasten —□— SK-N-FI —▲— CCL 136
—o— TE-85* —●— SAOS-2*

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1984[21]

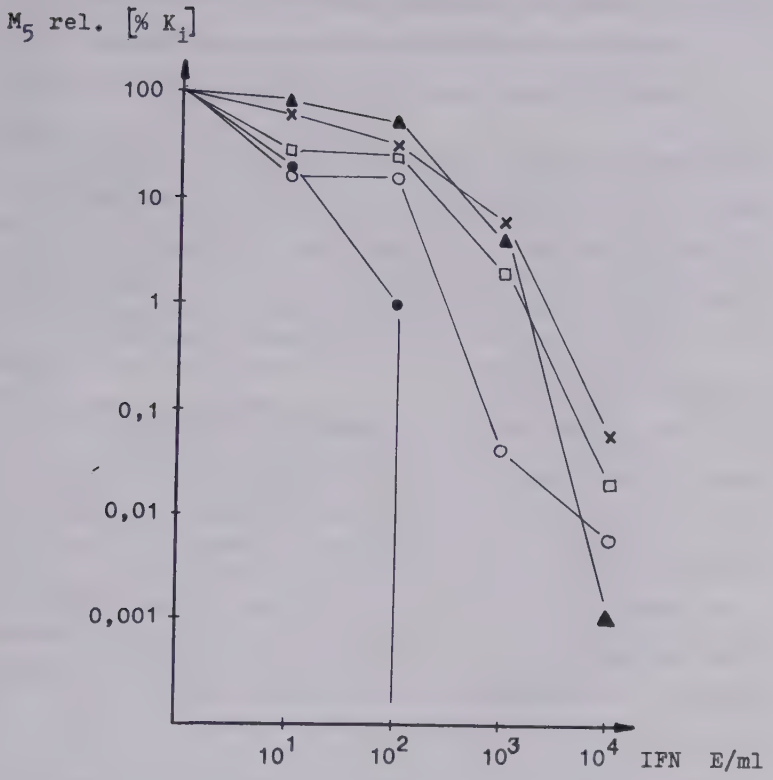

Abb. 79: Vergleich der relativen iterativen Wachstumsraten der verschiedenen Zellinien in Abhängigkeit von IFN-β (10^1,...,10^4 E/ml) nach 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml

—×— Fibroblasten —□— SK-N-FI —▲— CCL 136
—○— TE-85* —●— SAOS-2*

* siehe MAYER-EICHBERGER, S., 1985[21]

2.4. Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von IFN-β mit der einer Mock-Interferon-Präparation

Grundsätzlich stellt sich die Frage nach der Spezifität der wachstumshemmenden Wirkung von Interferon. Ist diese Wirkung allein dem Interferon zuzuschreiben oder sind Verunreinigungen des Interferons durch Proteine oder andere Stoffe für die Wachstumshemmung mitverantwortlich[2,4]?

Wir vergleichen dazu die Wirkung von IFN-β mit der spezifischen Aktivität von $0,7 \cdot 10^6$ E/mg Protein (LOT 16A) mit der einer Mock-Präparation, die durch Hitzeinaktivierung aus einem Interferon mit der spezifischen Aktivität von $1 \cdot 10^6$ E/mg Protein (LOT 15B) hergestellt wurde. Die spezifische Aktivität des Mock-Interferons wird dadurch auf weniger als 90 E/mg Protein gesenkt. Beide Präparate werden von der Fa. RENTSCHLER, Laupheim, zur Verfügung gestellt.

Wir definieren 1 Einheit Mock-Interferon als die Proteinmenge, die 1 Einheit IFN-β entspricht.

Abb. 80 und 81 zeigen die iterativen Wachstumraten der mit IFN-β und mit Mock-Interferon behandelten Zellen der Zellinie SAOS-2. Schon 10^1 E/ml IFN-β bewirken eine deutliche Wachstumshemmung, während bei 10^1 E/ml Mock-Interferon, aber auch bei 10^2 und 10^3 E/ml keine wachstumshemmende Wirkung erkennbar ist. Einen sehr starken wachstumshemmenden

Effekt zeigen jedoch 10^4 E/ml Mock-Interferon, wobei die spezifische Aktivität weniger als 1 E/ml IFN-β beträgt. Die Wachstumshemmung entspricht der Wirkung von 10^3 E/ml IFN-β.

Wenn wir die beiden Extreme 10^1 E/ml und 10^4 E/ml vergleichen, so fällt auf, daß bei 10^1 E/ml IFN-β, d.h. 10 ng Protein/ml, die gesamte Wachstumshemmung auf die spezifische Wirkung des Interferons zurückzuführen ist, da hier die Mock-Präparation keine Wirkung zeigt, während bei 10^4 E/ml IFN-β, d.h. 10 μg Protein/ml, fast die gesamte Wirkung allein schon durch Begleitstoffe zustande kommt (Abb. 82). Aus diesen Versuchen können wir die Proteinmenge pro Zelle errechnen, bei der der Hauptteil der wachstumshemmenden Wirkung nicht durch das Interferon selbst, sondern durch Begleitstoffe bewirkt wird. Bei einer spezifischen Aktivität des Interferons von 10^6 E/mg Protein, einer Interferonkonzentration von 10^4 E/ml und einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Z/ml wirken auf eine Zelle 0,1 ng Protein ein. Diese Proteinmenge möchten wir als den Schwellenwert bezeichnen, bei dem die Wirkung der Interferonpräparation hauptsächlich durch Begleitstoffe verursacht wird. Abb. 83 faßt dieses Ergebnis nochmals zusammen und zeigt deutlich den Sprung von 10^3 nach 10^4 E/ml.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Beobachtungen von PFEFFER et al.[4], der in Versuchen mit einer anderen Mock-Präparation aber vergleichbarer

Proteinmenge pro Zelle keinen wachstumshemmenden Effekt beschreibt. PFEFFER verwendet ein Fibroblasteninterferon mit der spezifischen Aktivität von $5 \cdot 10^5$ E/mg Protein, eine maximale Konzentration von $2,5 \cdot 10^3$ E/ml IFN-β und eine Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Z/ml Medium. Es ergibt sich eine Proteinmenge von 0,5 ng Protein pro Zelle, also das fünffache unseres oben berechneten Schwellenwerts.

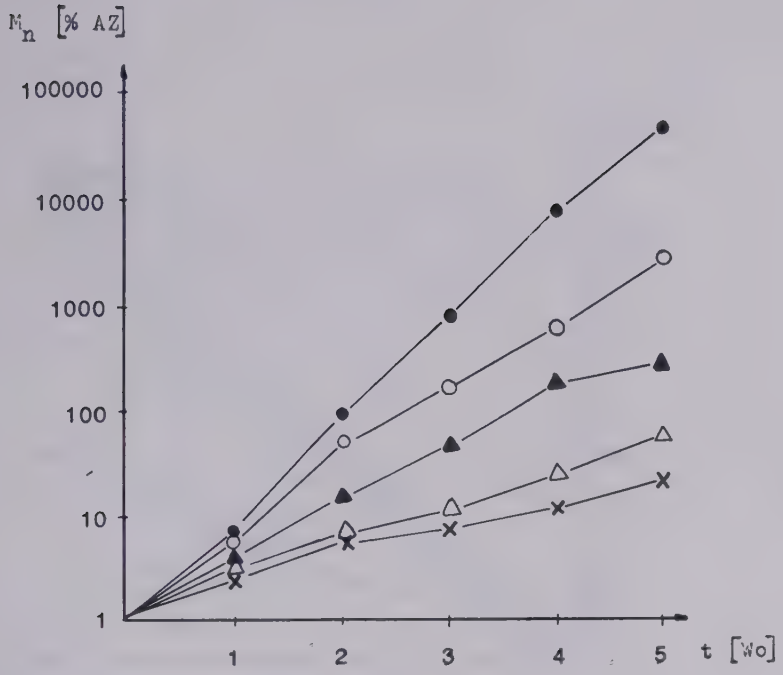

Abb. 80: Iterative Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von IFN-β (0, 10^1,...,10^4 E/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

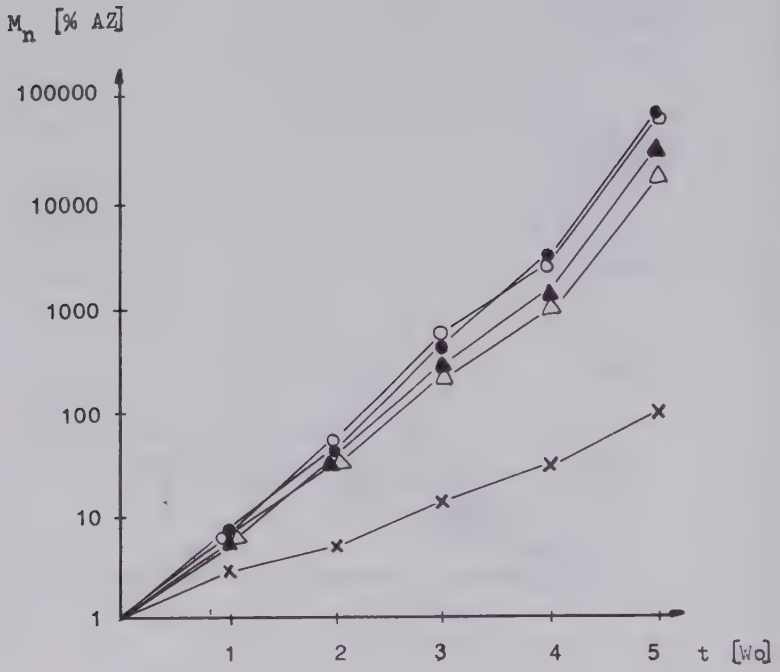

Abb. 81: Iterative Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von Mock-Interferon (0, 10^1,...,10^4 E Mock-IFN/ml) während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml.

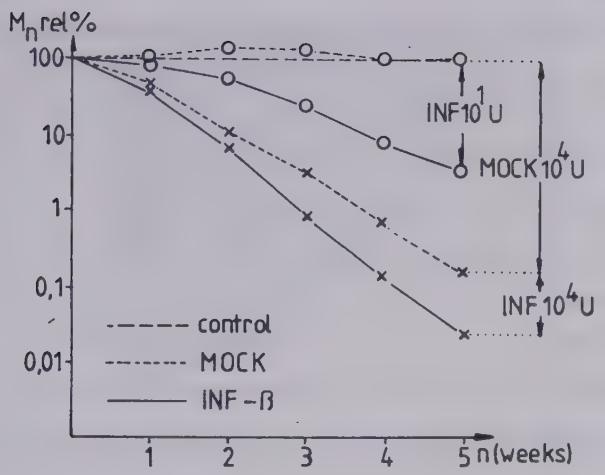

Abb. 82: Relative iterative Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von 10^1 E/ml IFN-β und Mock-IFN-β sowie 10^4 E/ml IFN-β und Mock-IFN-β während 5 Wochen bei einer Ausgangszellzahl von $1 \cdot 10^5$ Z/ml

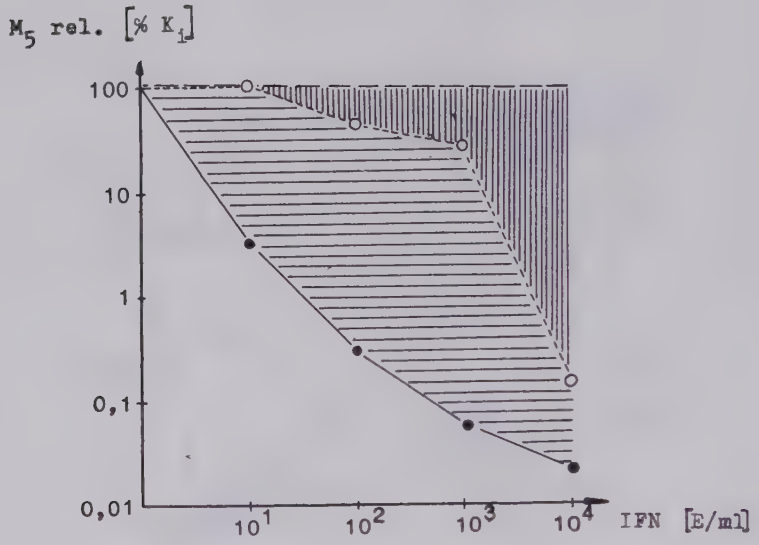

Abb. 83: Relative iterative Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 in Abhängigkeit von IFN-β und Mock-IFN-β
—•— IFN-β
— o — Mock-IFN-β

2.6. IFN-β in Kombination mit Methotrexat

Von großem Interesse ist die Kombination von Interferon mit anderen Substanzen, die die Zellteilung hemmen, gerade in Bezug auf die klinische Relevanz. Wir kombinieren IFN-β mit dem Folsäure-Analogen Methotrexat. Methotrexat hat eine höhere Affinität zur Dihydrofolatreduktase als die Dihydrofolsäure selbst und unterbricht dadurch den für die Synthese der Nucleinsäuren wichtigen C_1 - Stoffwechsel. Uns interessiert nun, inwieweit sich die Wirkungen der beiden Medikamente ergänzen.

Für die Kombinationstherapie benützen wir Medikamentenkonzentrationen mit keinem oder nur geringen Effekt auf das Zellwachstum, also Konzentrationen, die im Bereich der minimalen Hemmkonzentration liegen. Diese definieren wir als die geringste Konzentration, bei der eine signifikante wachstumshemmende Wirkung zu sehen ist.

Wir kombinieren 10^0, 10^1, 10^2 E/ml IFN-β (10^1 E/ml = minimale Hemmkonzentration) mit 5, 10, 25 nM Methotrexat (25 nM = minimale Hemmkonzentration).

Wir definieren:

Die Wirkung der Kombination ist additiv, wenn folgende Bedingung erfüllt ist:

$$\bar{x}_{IFN-\beta + MTX} - \sigma \leq \frac{\bar{x}_{IFN-\beta} \quad \bar{x}_{MTX}}{100} \leq \bar{x}_{IFN-\beta + MTX} + \sigma$$

$\bar{x}_{IFN-\beta}$, $\bar{x}_{MTX}$, $\bar{x}_{IFN-\beta+MTX}$ sind die Durchschnittswerte der Wachstumsraten der Zellinie SAOS-2 bei Behandlung mit IFN-β, MTX und der Kombination von IFN-β mit MTX, angegeben in % der Wachstumsrate der Kontrolle. Die Durchschnittswerte werden aus 6 Versuchswerten bei den Einzelwerten und aus 18 Versuchswerten bei den Kontrollen errechnet.
Als σ bezeichnen wir die Standardabweichung der jeweiligen Mittelwertbildung (siehe Tab. 3).
Die Zellen der Osteosarkomzellinie SAOS-2 werden in einer Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml angesetzt, gleichzeitig werden Interferon und Methotrexat dazugegeben. Nach 4 Tagen wird das Medium erneuert und nur Interferon dazugegeben, nach 1 Woche werden die Zellen gezählt. Zum Vergleich werden 3 Kontrollgruppen mitgeführt, eine ohne Behandlung, eine nur mit Interferon, die dritte nur mit Methotrexat.

Kontrolle 1:	1	2	3	4	5	6	7 Tage
Kontrolle 2:	1 ↑ IFN	2	3	4 ↑ IFN	5	6	7 Tage
Kontrolle 3:	1 ↑ MTX	2	3	4	5	6	7 Tage
Kombination:	1 ↑ MTX IFN	2	3	4 ↑ IFN	5	6	7 Tage

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.
Im Grenzbereich der minimalen Hemmkonzentrationen 10^1 E/ml IFN-β mit einer Wachstumshemmung auf 70%

(Vertrauensbereich 66% - 74%) und 25 nM MTX mit einer Wachstumshemmung auf 79% (Vertrauensbereich 65% - 93%) erhalten wir bei der Kombination eine Wachstumshemmung auf 63% (Vertrauensbereich 59 - 67 %), laut obiger Definition liegt hier keine additive Wirkung vor. Bei der Kombination von 10^0 E/ml IFN-β mit 5 nM MTX, also Konzentrationen, die unterhalb der minimalen Hemmkonzentration liegen und alleine keine Wachstumshemmung bewirken, erhalten wir eine Reduktion des Wachstums auf 84% der Kontrolle. Im wirksamen Bereich der Stoffe bei 10^2 E/ml IFN-β und 25 nM MTX können wir ebenfalls eine Addition der Wachstumsreduktion sehen, jedoch liegt sie an der Grenze unserer Definition.

Insgesamt erhalten wir in 8 von 9 Kombinationen einen additiven Effekt, in einer Kombination (10^1 E/ml IFN-β und 25 nM MTX) ist die Wirkung nicht additiv. Der Versuch bestätigt unsere Vermutung, daß sich die Wirkungen von IFN-β und MTX addieren. Methotrexat als Folsäure-Antagonist und Interferon, dessen Wirkungsmechanismus noch unbekannt ist, möglicherweise spielt die 1.5-Synthetase eine Rolle, können unabhängig voneinander voll zur Wirkung kommen, ein Potenzierungseffekt wird nicht beobachtet.

Diese Versuche stellen nur einen kleinen Anfang bei der Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten von Interferonen mit Zytostatika dar. Sie sollen in dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt werden.

INF / MTX	0 [U/ml]	10^0	10^1	10^2
0 [nM]	$\bar{x}$ $\bar{x}+\sigma$ — $\bar{x}-\sigma$ $\frac{\bar{x}(INF)\cdot\bar{x}(MTX)}{100}$	93 103 — 83	70 74 — 66	54 61 — 47
5	94 107 — 81	84 98 — 70 87	63 80 — 46 66	65 80 — 50 51
10	104 88 — 120	84 94 — 74 97	66 70 — 62 73	47 61 — 33 56
25	79 93 — 65	69 84 — 54 73	63 67 — 59 55	50 57 — 43 43

Tabelle 3: Kombination von IFN-β mit Methotrexat

$\bar{x}$ = Durchschnittswert der relativen Wachstumsraten, angegeben in % der Kontrolle

DISKUSSION

Unsere Versuche zeigen, daß sowohl Fibroblasten- als auch Leukozyteninterferon einen wachstumshemmenden Effekt auf alle von uns untersuchten Zellinien kindlicher Tumoren und Fibroblasten ausüben und bestätigen so generell auch die Ergebnisse von TREUNER et al.[5] sowie STRANDER und EINHORN[1,2,3]. Fibroblasteninterferon, gemessen in internationalen Einheiten, wirkt in den Monolayer-Zellkulturen bei vergleichbarer spezifischer Aktivität von ca. 10^6 E/mg Protein durchweg stärker als Leukozyteninterferon. Die Wirkung von 10^x E/ml IFN-β entspricht größenordnungsmäßig der von 10^{x+1} E/ml IFN-α.
Wenn wir dieses Ergebnis kritisch würdigen, müssen wir uns ins Gedächtnis zurückrufen, daß die Definition der Internationalen Interferoneinheit auf der antiviralen Wirkung beruht, jedoch nicht geklärt ist, inwieweit antivirale und antiproliferative Wirkung zusammenhängen. Noch schwieriger ist es, die Wirkungen von IFN-α und IFN-β in vivo zu vergleichen, da hier zusätzlich Serumspiegel, ein großes Wirkungsspektrum und der Metabolismus als Veränderliche eingehen.
EINHORN und STRANDER stellen bei 9 Osteosarkomzelllinien einen stärkeren wachstumshemmenden Effekt des Fibroblasteninterferons fest, hingegen ist die Wirkung von Leukozyteninterferon auf viele lymphoide Zellinien stärker ausgeprägt[2]. KUWATA beobachtet

bei den transformierten Zellen RSa und RSb einen stärkeren antiproliferativen Effekt von IFN-β[10]. Er beschreibt, daß die antivirale Wirkung in ihrer Stärke unabhängig von der wachstumshemmenden Wirkung variiert. Auch Resistenzen gegenüber der einen oder anderen Wirkung treten unabhängig voneinander auf.

Die Wirkung von IFN-α und IFN-β ist dosisabhängig bei Konzentrationen von 10^1 E/ml bis 10^4 E/ml und Zelldichten von $1 \cdot 10^5$ Z/ml und $2{,}5 \cdot 10^4$ Z/ml. Die Einzelergebnisse sind quantitativ schwer mit denen anderer Autoren zu vergleichen, weil Medium, Konzentration an foetalem Kälberserum, Zelldichte und Interferonkonzentration unterschiedlich angesetzt werden. Wie wir in Kap. 1.3. gesehen haben, sind dies Faktoren, die Einfluß auf die Zellvermehrung haben. Zum Vergleich eignet sich außer der Interferonkonzentration pro ml Medium auch die Menge an Interferon, die auf eine einzelne Zelle einwirkt.

Die Wirkung von IFN-α und IFN-β auf die Zellinie FS-4, die von Fibroblasten abstammt, hängt neben der Interferonkonzentration wesentlich von der Zelldichte ab, die die Proliferationsrate der Zellen beeinflußt. Bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Z/ml und einer maximalen wöchentlichen Proliferationsrate von 300% zeigen nur 10^3 E/ml und 10^4 E/ml IFN-β eine Wirkung, die gemäß unseren Versuchen mit Mock-Interferon

durch Fremdsubstanzen hervorgerufen sein könnte. Bei einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml und einer maximalen wöchentlichen Proliferationsrate von 1100% bewirken schon 10^2 E/ml IFN-β und 10^3 E/ml IFN-α eine signifikante Wachstumshemmung auf 80% bzw. 77% der Kontrolle. Bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ Z/ml beobachten EINHORN und STRANDER eine Wachstumsreduktion auf 50% der Kontrolle in 2 Wochen durch 10^2 E/ml IFN-α bei 3 Fibroblastenzellinien (GM-258, 393S, S2)[1].

STRANDER und EINHORN untersuchen die wachstumshemmende Wirkung von Leukozyteninterferon bei 9 Osteosarkomzellinien und stellen eine gute Wirksamkeit schon in einer Konzentration von 10^1 E/ml IFN-α fest[2]. Darüberhinaus zeigen sie, daß die Wirksamkeit von IFN-α auch von der Passagezahl abhängig ist: Zellen mit niedriger Passagezahl reagieren empfindlicher als solche mit hoher. Zum Vergleich dieser Ergebnisse mit denen in unserer Arbeit ist zu berücksichtigen, daß STRANDER und EINHORN mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^1$ Z/ml arbeiten und Interferonkonzentrationen von 10^1 E/ml und 10^2 E/ml IFN-α verwenden, die den Serumspiegeln entsprechen, die sie bei Osteosarkompatienten unter Interferontherapie gemessen haben. Die Interferonkonzentration pro Zelle beträgt also bei 10^1 E/ml IFN-α $2 \cdot 10^{-1}$ E/Z und bei 10^2 E/ml IFN-α 2 E/Z. Die Osteosarkomzellinien TE-85 und SAOS-2 werden von uns mit einer Dichte

von $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml und $1 \cdot 10^5$ Z/ml angesetzt und mit Interferonverdünnungen von 10^1 E/ml bis 10^4 E/ml IFN-α oder IFN-β behandelt. Wir erhalten also bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Z/ml 10^{-4} bis 10^{-1} E/Z und bei einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Z/ml $4 \cdot 10^{-4}$ bis $4 \cdot 10^{-1}$ E/Z. STRANDER und EINHORN messen bei $2 \cdot 10^{-1}$ E IFN-α/Z nach 4 Wochen eine Wachstumshemmung der Zellinie SAOS-2 auf 30% der Kontrolle und der Zellinie TE-85 auf 35% der Kontrolle. Wir erhalten eine durchschnittliche Wachstumsreduktion bei Behandlung mit $4 \cdot 10^{-1}$ E IFN-α/Z auf 11% der Kontrolle bei SAOS-2 und auf 24% der Kontrolle bei TE-85, bei Behandlung mit 10^{-1} E/Z auf 13% der Kontrolle bei SAOS-2 und auf 45% der Kontrolle bei TE-85. Die Ergebnisse sind also in etwa vergleichbar, SAOS-2 ist in beiden Untersuchungen empfindlicher als TE-85. SAOS-2 zeigt in unserer Arbeit eine höhere Sensitivität gegenüber IFN-α als bei STRANDER und EINHORN. Sie ist auch die einzige Zellinie, die in unseren Versuchen sowohl bei Behandlung mit IFN-α als auch mit IFN-β bei Konzentrationen von 10^3 E/ml bzw. 10^4 E/ml das Wachstum nicht nur einstellt, sondern sogar abstirbt.

Diese in vitro gewonnenen Ergebnisse stimmen überein mit Therapieerfolgen, die EINHORN und STRANDER durch Einsatz von IFN-α an Osteosarkompatienten erzielen können[1]. Sie werden gegenwärtig als kontrollierte Studien in Europa und USA überprüft und mit Behandlungsergebnissen konventioneller Zytostatika

verglichen.

Zur Untersuchung der anderen Tumoren des Kindesalters liegen bis auf die Untersuchungen von TREUNER et al.[5] keine detaillierten Ergebnisse vor, die mit unseren verglichen werden könnten. Grundsätzlich ist die Sensitivität der anderen Zellinien gegenüber IFN-α und IFN-β wesentlich geringer als die der beiden Osteosarkomzellinien SAOS-2 und TE-85. Relativ gut spricht noch die Nasopharynxcarcinomzellinie CCL 138 auf IFN-β an und korrespondiert so mit der erfolgreichen Behandlung eines Kindes mit Nasopharynxcarcinom durch IFN-β von TREUNER et al.[6].

Die Frage, inwieweit die Hemmung der Zellteilung eine spezifische Wirkung des Interferons ist, untersuchen wir, indem wir IFN-β mit seiner Mock-Präparation, die durch Hitzeinaktivierung aus IFN-β gewonnen wird, vergleichen. Wie in Kap. 2.4. dargestellt ist, wird ein erheblicher Teil der Wirkung bei einer Konzentration von 10^4 E/ml allein schon durch Mock-Interferon hervorgerufen. Die geringe Wirkung einer Mock-Präparation (10^3 E/ml) bei STRANDER und EINHORN [2] und die totale Wirkungslosigkeit einer Mock-Präparation von IFN-β bei PFEFFER et al.[4] stimmen nicht mit unseren Ergebnissen überein. AGUET hat einen spezifischen Rezeptor für die Interferonwirkung bei Mäusen nachgewiesen[8], so daß wir auch im menschlichen System von einer Rezeptorbindung als erstem Schritt der Interferonwirkung aus-

gehen dürfen. Inwieweit jetzt die Mockwirkung auf Begleitproteine zurückgeht, die um diesen Rezeptor konkurrieren oder andere Rezeptoren bedienen oder einen anderen Wirkungsmechanismus haben, oder durch toxische Begleitsubstanzen des Interferons verursacht wird, bleibt weiteren Untersuchungen auch mit höher gereinigten Interferonen überlassen.

Unsere Untersuchungen über die Reversibilität der Interferonwirkung bei der Osteosarkomzellinie SAOS-2 und der Nasopharynxcarcinomzellinie CCL 138 zeigen[21], daß die Wirkung des Interferons reversibel ist und eine Tendenz zu kompensatorischer Steigerung des Wachstums nach Absetzen der Interferontherapie besteht. Der Wiederanstieg der Wachstumsrate erfolgt bei CCL 138 sofort, bei SAOS-2 mit einer Latenz von einer Woche. Nur die Zellen, die mit 10^4 E/ml IFN-β behandelt werden, erholen sich nicht mehr. Hier kann der Mock-Effekt eine Erklärung liefern. Die Latenz des Wachstumsanstiegs bei SAOS-2 zusammen mit der hohen Sensitivität gegenüber IFN-α und IFN-β könnte durch eine höhere Zahl von Interferonrezeptoren erklärt werden. PFEFFER et al. zeigen, daß die Interferonanlagerung schon nach 1 Stunde erfolgt sein muß, und daß die Wachstumshemmung nach Absetzen der Interferonbehandlung innerhalb einer Periode von vier Tagen irreversibel ist[4]. Sie vermuten, daß entweder die Interferonbindung an die Zellen bestehen bleibt, oder daß Interferon in einer kurzen

Zeitspanne einen langdauernden wachstumshemmenden Effekt verursacht. Unsere Versuche, die sich über eine Dauer von maximal vier Wochen nach Absetzen der Interferontherapie erstrecken, zeigen jedoch, daß Interferon seine Wirkung einbüßt, und die Wachstumsraten der mit Interferon behandelten Zellen das Kontrollwachstum sogar übertreffen. Dies geht möglicherweise mit der Lösung des Interferons vom Rezeptor und der Information zur Zellteilung einher. Auch diese Beobachtungen können erst durch genauere Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus der Interferone geklärt werden.

Die Wirkung der Kombination von IFN-α und IFN-β ist bei den Osteosarkomzellinien SAOS-2 und TE-85 unterschiedlich. Die empfindlichere Zellinie SAOS-2 zeigt deutlich einen additiven bis überadditiven Effekt, während sich bei der etwas weniger empfindlichen Zellinie TE-85 die Wirkungen von IFN-α und IFN-β aufheben. Es ist denkbar, daß IFN-α und IFN-β jeweils spezifische Oberflächenrezeptoren benützen, die einmal eine Addition der Wirkung ergeben, das andere Mal sich aber in ihrer Wirkung in der Zelle blockieren[21].

Die Kombinationsversuche des Zytostatikums Methotrexat mit Fibroblasteninterferon beim Osteogenen Sarkom SAOS-2 deuten auf eine Addition der wachstumshemmenden Wirkung hin, was bei sicherlich ganz unterschiedlichen Wirkprinzipien auch angenommen werden darf.

BROSTRÖM untersucht die Kombination von Leukozyteninterferon mit Methotrexat in Konzentrationen (IFN-α: 0,1 E/ml - 1 E/ml, MTX: 1,9 nM - 10 nM), die auch im Serum von Patienten gemessen werden[11]. Er benützt menschliche Osteosarkom- und Lymphomzellinien und arbeitet mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ Z/ml. Er kann weder einen synergistischen noch blockierenden Effekt feststellen. Dieser Widerspruch ist unklar und muß durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Zusammenfassend können wir sagen, daß sowohl Fibroblasten- als auch Leukozyteninterferon das Zellwachstum hemmen, daß Fibroblasteninterferon bei den Zellinien des Osteogenen Sarkoms (SAOS-2, TE-85), des Nasopharynxcarcinoms (CCL 138), des Neuroblastoms (CCL 127, SK-N-FI), des Rhabdomyosarkoms (CCL 136) und der Fibroblasten (FS-4) stärker wirkt als Leukozyteninterferon. Aufgrund der guten in vitro Ergebnisse beim Osteogenen Sarkom und Nasopharynxcarcinom ist der klinische Einsatz von Interferon bei diesen Tumoren denkbar. Die Additivität der Wirkung von Fibroblasteninterferon und Methotrexat gibt einen Hinweis darauf, daß Kombinationen von Interferonen mit herkömmlichen Zytostatika eine wirksame Therapie bei Tumoren darstellen können, wobei die Nebenwirkungen der Medikamente durch Dosisreduktion eingeschränkt werden könnten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. EINHORN, S. und STRANDER, H. (1978) Interferon Therapy for Neoplastic Diseases in Man in vitro and in vivo Studies, in: Human Interferon - Production and Clinical Use, Adv. Exp. Med. Biol. Vol. 110
2. STRANDER, H. und EINHORN, S. (1977) Effect of Human Leukocyte Interferon on the Growth of Human Osteosarcoma Cells in Tissue Culture, Int. J. Cancer: 19, S. 468 - 473
3. EINHORN, S. und STRANDER, H. (1977) Is Interferon Tissue Specific? - Effect of Human Leukocyte and Fibroblast Interferons on the Growth of Lymphoblastoid and Osteosarcoma Cell Lines, J. Gen. Virol., 35, S. 573 - 577
4. PFEFFER, L.M., MURPHY, J.S., TAMM, I. (1979) Interferon Effects on the Growth and Division of Human Fibroblasts, Exp. Cell Res. 121, S. 111 - 120
5. TREUNER, J., DANNECKER, G. und NIETHAMMER, D. (1980) Zellwachstumshemmender Effekt von Interferon unter experimentellen und klinischen Bedingungen, 16. Arbeitstagung für pädiatrische Forschung, Göttingen
6. TREUNER, J., NIETHAMMER, D., DANNECKER, G., HAGMANN, R., NEEF, V. und HOFSCHNEIDER, P.H. (1980) Successful Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma with Interferon, The Lancet, S. 817-818

7. TREUNER, J. und DANNECKER, G. (1981) Interferon - Grundlagen und bisherige klinische Anwendung, Fortschr. Med. 99, Jahrg. 21, S. 807 - 813

8. AGUET, M. (1980) High Affinity Binding of ^{125}I-labelled Mouse Interferon to a specific Cell surface Receptor, Nature Vol. 284, S. 459 - 461

9. DAHL, H. und DEGRÉ, M. (1976) Human Interferon and Cell Growth Inhibition, Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 84, S. 285 - 292

10. KUWATA, T., FUSE, A., SUZUKI, N., MORINAGA, N. (1979) Comparison of the Supression of Cell and Virus Growth in Transformed Human Cells by Leukocyte and Fibroblast Interferon, J. Gen. Virol., 43, S. 435 - 439

11. BROSTRÖM, L. (1980) The Combined Effect of Interferon and Methotrexate on Human Osteosarcoma and Lymphoma Cell Lines, Cancer Letters 10, S. 83 - 90

12. STRANDER, H. (1977) Interferons: Anti-Neoplastic Drugs?, Blut 35, S. 277 - 288

13. SANDERS, K. (1979) A Possible Approach to the Therapy of Cancer: Interferon, presented at: 1st International Congress of Viral Oncology September 1979

14. KIRCHNER, H., BECKER, H., HIRT, H.M. und ZAWATZKY, R. (1979) Interferone: Proteine mit antiviralen, antiproliferativen und immunregulatorischen Eigenschaften, Pharmazie in unserer Zeit, 8. Jahrg., Nr. 4, S. 113 - 118

15. MARX, J.L. (1979) Interferon (II): Learning about how it Works, Science, Vol. 204, S. 1293 - 1295

16. STANTON, G.J., JOHNSON, H.M., BARON, S. (1978) The Role of Interferon in Virus Infections and Antibody Formation, Pathobiology Annual, Vol. 8, New York 1978, S. 285 - 308

17. ISAACS, A. und LINDENMANN, J. (1957) Virus Interference. I. The Interferon, Proc. Roy. Soc. B. 147, S. 258 - 276

18. FRIDMAN, W.H., GRESSER, I., BANDU, M.T., AGUET, M., NEAUPORT-SAUTES, C. (1980) Interferon Enhances the Expression of Fcγ Receptors, The Journal of Immunology, Vol. 124, No. 5, S. 2436 - 2441

19. STEWART II, W.E. (1979), The Interferon System, Springer-Verlag, Wien - New York

20. CZIHAK, G., LANGER, H., ZIEGLER, H. (1981) Biologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York S. 164

21. MAYER-EICHBERGER, S. (1984) Einfluß von Leukozyten- und Fibroblasteninterferon auf die Zellvermehrung von Tumoren im Kindesalter in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Osteogenem Sarkom und Nasopharynxcarcinom, Tübingen

ZUSAMMENFASSUNG

Fibroblasten und etablierte Zellinien maligner Tumoren des Kindesalters (Neuroblastom und Rhabdomyosarkom) werden mit IFN-α und IFN-β vergleichend behandelt. Dabei zeigt sich generell eine größere Empfindlichkeit der malignen Zellen. Die wachstumshemmende Wirkung von IFN-β ist stärker als die von IFN-α.

Die spezifisch zytostatische Wirkung von IFN-β wird im Vergleich zur Wirkung einer Mock-Präparation anhand einer Osteosarkomzellinie nachgewiesen. Kombiniert man IFN-β mit Methotrexat in verschiedenen Konzentrationen, so zeigt sich anhand der Osteosarkomzellinie SAOS-2 ein additiver Effekt.

Die eigenen Ergebnisse werden mit denen der Doktorarbeit von Sabine Mayer-Eichberger mit dem Titel " Einfluß von Leukozyten- und Fibroblasteninterferon auf die Zellvermehrung von Tumoren im Kindesalter in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Osteogenem Sarkom und Nasopharynxcarcinom" verglichen.

Herrn Prof. Dr. Niethammer danke ich für die Überlassung dieser Arbeit.
Für die Heranführung an das Thema danke ich Herrn Oberarzt Dr. Treuner, der mir mit Begeisterung zur Seite stand.
Für hilfreiche technische Anleitung bedanke ich mich bei Frau A. Hettinger und Frau F. d'Oleire, sowie bei Frau Schaffer für die Bereitstellung und Wartung des Brutschranks.
Frau Dr. Diddens stellte mir freundlicherweise Methotrexatverdünnungen zur Verfügung.
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Forschergruppe Leukämieforschung), der Firma Dr. Rentschler, insbesondere den Herren Joester und Pakosch für Interferon-Spiegelmessungen und großzügige Bereitstellung vieler Materialien, spreche ich meinen besonderen Dank aus.
Die Arbeit wurde als Teamarbeit vergeben und in enger Zusammenarbeit mit meiner Frau Sabine erstellt[21].
Für die gute Zusammenarbeit danke ich meiner Frau ganz herzlich.

LEBENSLAUF Dieter Mayer-Eichberger

7. 5. 1948	Geburt als Sohn des Oberstudienrats Erwin Mayer und seiner Frau Elsa, geb. Ball, in Stuttgart
1968	Abitur am Friedrich-Eugen-Gymnasium in Stuttgart
1968 - 1976	Studium der Mathematik mit Nebenfach Physik (Vordiplom) und Volkswirtschaft (Diplom) sowie Philosophie in Tübingen
1971 / 1972	Auslandsaufenthalt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes in Nizza, Frankreich (Maitrise de Mathematique)
1976 - 1978	Diplomarbeit in Mathematik an der Universität Tübingen
1976 - 1982	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
1980 / 1981	Experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung für pädiatrische Hämatologie der Universitäts-Kinderklinik Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. Niethammer
3. 11. 1982	III. Staatsexamen in Humanmedizin an der Universität Tübingen
seit 1. 1. 83	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pathologie der Universität Tübingen